



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**EFFECTO DEL TERMOULTRASONIDO SOBRE PROPIEDADES DE LA LECHE
E INACTIVACIÓN DE AFLATOXINA M₁ DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciadas en Nutrición

P R E S E N T A N

P. L. Nutric. Tania Atzimba Hernández Falcón

P. L. Nutric. Araceli Monter Arciniega

Bajo la Dirección de:

Dra. Nelly Del Socorro Cruz Cansino

Codirectores:

Dr. Ernesto Alanís García

Dra. Esther Ramírez Moreno



Pachuca de Soto, Hgo., Septiembre 2017

ÍNDICE GENERAL

I.	ÍNDICE DE TABLAS	IV
II.	ÍNDICE DE FIGURA	V
III.	ABREVIATURAS	VI
1	RESUMEN	1
2	SUMMARY	3
3	MARCO TEÓRICO	5
3.1	Consumo de leche a nivel mundial, nacional y estatal	5
3.2	Importancia nutricional de la leche	6
3.2.1	Antioxidantes en la leche	10
3.3	Especificaciones de la leche	10
3.3.1	Aflatoxinas	11
3.3.2	Presencia de aflatoxinas en leche	13
3.4	Procesamiento de la leche	14
3.4.1	Pasteurización rápida	15
3.4.1	Pasteurización lenta o discontinua	16
3.4.2	Leche ultrapasteurizada (UHT)	16
3.5	Ultrasonido	17
3.5.1	Termoultrasonido	19
4	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	21
5	JUSTIFICACIÓN	22
6	OBJETIVOS	23
6.1	Objetivo general	23
6.2	Objetivos específicos	23

7	DISEÑO METODOLÓGICO.....	25
7.1	Obtención de la muestra	25
7.2	TIPO DE ESTUDIO	26
7.3	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	26
7.3.1	Homogenización	27
7.3.2	Pasteurización	27
7.3.3	Termoultrasonido	27
7.4	Almacenamiento	28
7.5	Determinación del análisis químico proximal (AQP).....	28
7.6	Determinación de las propiedades fisicoquímicas	29
7.6.1	Determinación del pH	29
7.6.2	Determinación de la acidez titulable	29
7.6.3	Determinación de la densidad, sólidos totales y sólidos no grasos	30
7.6.4	Determinación de índice de estabilidad física	30
7.6.5	Determinación de la fosfatasa alcalina	31
7.6.6	Determinación del color	31
7.7	Determinación de la calidad microbiológica	32
7.7.1	Mesófilos aerobios y enterobacterias.....	32
7.7.2	Determinación de aflatoxina M ₁	32
7.8	Determinación de la actividad antioxidante	33
7.8.1	Extracción de compuestos antioxidantes	33
7.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
8.1	Análisis químico proximal (AQP).....	37
8.2	Propiedades fisicoquímicas.....	39

8.2.1 Estabilidad	43
8.2.2 Fosfatasa alcalina	44
8.2.3 Color	46
8.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA	50
8.3.1 Mesófilos aerobios y enterobacterias.....	50
8.3.2 Aflatoxinas	53
8.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	55
8.4.1 Compuestos fenólicos totales	55
8.4.2 Actividad antioxidante por ABTS•+	56
8.4.3 Actividad antioxidante por DPPH•	59
8.4.4 Actividad antioxidante por FRAP	60
9 CONCLUSIONES	62
10 RECOMENDACIONES	63
11 REFERENCIAS	64
12 ANEXOS	80

I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – Contenido de lípidos en la leche	7
Tabla 2 - Perfil de ácidos grasos de la leche.....	8
Tabla 3 - Distribución de las proteínas de la leche	9
Tabla 4 – Especificaciones fisicoquímicas y sanitarias de la leche	11
Tabla 5 - Condiciones ambientales para el crecimiento de hongos productores de aflatoxinas	12
Tabla 6 - Muestras de estudio	25
Tabla 7 - Temperatura inicial y final de las diferentes muestras después del tratamiento	28
Tabla 8 - Valores medios (\pm DE) de análisis químico proximal de leche tratada.....	37
Tabla 9 - Valores promedio (\pm DE) de las propiedades fisicoquímicas de las muestras	40
Tabla 10 - Valores promedio (\pm DE) de los parámetros y diferencia de color durante el almacenamiento	49

II. ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 - Regiones con mayor producción de leche en México.....	6
Figura 2 - Estructura de la micela de caseína y sus subunidades.....	9
Figura 3 - Estructura química de las aflatoxinas.....	12
Figura 4 - Etapas del fenómeno de cavitación	18
Figura 5 - Diagrama del diseño metodológico.....	26
Figura 6 - Equipo de termoultrasonido	28
Figura 7 - Índice de estabilidad de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C.....	44
Figura 8 – Prueba de fosfatasa alcalina en los días 0 y 7 de almacenamiento.....	45
Figura 9 – Contenido de mesófilos aerobios (A) y enterobacterias (B) de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C.....	51
Figura 10 – Análisis del contenido de aflatoxina M ₁ de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C.....	54
Figura 11 - Contenido de fenoles totales de las diferentes muestras entre los días de almacenamiento.....	56
Figura 12 - Actividad antioxidante por ABTS/ET (A) y ABTS/EAA (B) de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C.....	58
Figura 13 - Actividad antioxidante por DPPH de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C.....	59
Figura 14 - Actividad antioxidante mediante FRAP de las diferentes muestras durante el almacenamiento.....	61
Figura 15 - Curva de calibración de aflatoxina M ₁	80
Figura 16 - Curva de calibración de ácido gálico para fenoles totales	80
Figura 17 - Curva de calibración de TROLOX para el ensayo ABTS ⁺⁺	81
Figura 18 - Curva estándar de ácido ascórbico para el ensayo ABTS ⁺⁺	81
Figura 19 - Curva de calibración de TROLOX para el ensayo DPPH ⁺	82
Figura 20 - Curva de calibración de Fe (II) para el ensayo FRAP	82

III. ABREVIATURAS

ABTS^{•+}: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Abs: Absorbancia

AF: Aflatoxina

AQP: Análisis químico proximal

CL: Leche Control

DPPH[•]: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

EAA: Equivalentes de ácido ascórbico

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EROs: Especies reactivas de oxígeno

ET: Equivalentes de TROLOX

FRAP: Poder antioxidante de reducción férrica

HP: Leche Homogenizada – Pasteurizada

HTST: alta temperatura tiempo corto

HU-10: Leche Homogenizada – Termoultrasonificada – 10 min. – 95% Amplitud

HU-15: Leche Homogenizada – Termoultrasonificada – 15 min. – 95% Amplitud

KPa: Kilo pascales

LTLT: Baja temperatura tiempo largo

Min: Minutos

MPa: Mega pascales

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

ST: Sólidos totales

SNG: Sólidos no grasos

TPTZ: 2,4,6-Tri(2-piridil)s-triazina

UHT: Temperatura ultra alta

U-10: Leche Termoultrasonificada – 10 min. – 95% Amplitud

U-15: Leche Termoultrasonificada – 15 min. – 95% Amplitud

1 RESUMEN

La pasteurización es el proceso que principalmente se aplica a la leche sin embargo, afecta sus propiedades nutricionales, además en la producción de leche existe un problema sobre el contenido de aflatoxina (AF), representando un riesgo para la salud humana, por ello es necesario ofrecer tecnologías alternativas que eliminen micotoxinas y al mismo tiempo obtener leche con mínimos cambios nutricionales que cumpla con las medidas higiénico-sanitarias. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del termoultrasonido sobre las propiedades de la leche e inactivación de AFM₁ durante el almacenamiento para asegurar su inocuidad. Se utilizaron seis tipos de muestras (4 por termoultrasonido, 1 pasteurizado y 1 control) fueron determinadas: análisis químico proximal (AQP), propiedades fisicoquímicas, análisis microbiológico, cuantificación de AFM₁ y de antioxidantes los días 0, 7 y 14. Todas las muestras presentaron variaciones durante el almacenamiento en los parámetros analizados, con valores que cumplieron con las recomendaciones de las Normas Oficiales Mexicanas, excepto en pH y acidez; estos disminuyeron y aumentaron de forma gradual, respectivamente. Comparando las muestras la leche U-15 (Termoultrasonificada-15 min.) presentó la más alta estabilidad (3.1-3.7%) todos los días. La muestra control, U-10 (Termoultrasonificada-10 min.) y HU-10 (Homogenizada-Termoultrasonificada-10 min.) presentaron mayor luminosidad en el día 14, y mayor cromaticidad y saturación en el día 0. Las muestras que presentaron menor diferencia de color con respecto a la leche pasteurizada fueron la U-10 y HU-15 (Homogenizada-Termoultrasonificada-15 min.) y con la control la HU-10. Las muestras termoultrasonificadas, así como el control tuvieron valores positivos en fosfatasa alcalina. Sin embargo, en el conteo de mesófilos aerobios, las muestras tratadas en el día 0 se encontraron dentro de la norma (≤ 5 Log UFC/mL), excepto la HU-10, mientras que en enterobacterias solo la HU-15 (1 Log UFC/mL). En el día 14 la muestra U-15 presentó un valor menor en mesófilos aerobios, seguido de la U-10, mientras que en enterobacterias la menor fue la leche pasteurizada seguida de la HU-15. Cabe resaltar que todas las muestras termoultrasonificadas tuvieron una disminución en la concentración de AF, siendo la U-10 la que presentó menor contenido (149.99 EAFM₁

pg/mL), incluso por debajo de la muestra pasteurizada. Finalmente, con respecto a la actividad antioxidante, en el día 0 las muestras tratadas presentaron mayor contenido de antioxidantes, excepto en ABTS/EAA (Equivalente de ácido ascórbico) y DPPH. En el día 14 la actividad antioxidante por ABTS/EAA, DPPH y FRAP aumentó en la HU-15, U-15 y HU-10, respectivamente. Estos resultados pudieran indicar que la aplicación del termoultrasonido representa una buena alternativa para el procesamiento de la leche, ya que además de disminuir la carga microbiana y el contenido de AF, puede conservar la calidad nutricional.

Palabras clave: leche, termoultrasonido, aflatoxinas, almacenamiento

2 SUMMARY

The pasteurization is the process that mainly is applied in the milk, however, this affect their nutritional properties. Besides in milk production there is a problem on the aflatoxin (AF) content, representing a risk to human health, therefore is necessary to offer technological alternatives that eliminate this micotoxins and obtain milk with minimal nutritional changes, complying with hygiene-sanitary measures. The aim of this study was to evaluate the effect of termoultrasound on properties of milk and inactivation of AF in milk during storage to ensure their safety. Six types of samples were used (4 termoultrasonicated, 1 pasteurized and 1 control), proximal chemical analysis (PCA), physicochemical properties, microbiology, quantification of AFM₁ and antioxidants were determined on days 0, 7 and 14. All samples presented variations during storage on the parameters analyzed, keeping values within of recommendations the Mexican Official Norms, except in pH and acidity, these gradually decreased and increased respectively during storage. Comparing the samples, U-15 milk (Termoultrasonicated-15 min.) showed the highest stability (3.1-3.7%) all days. The control sample, U-10 (Termoultrasonicated-10 min.) and HU-10 (Homogenized-Termoultrasonicated-10 min.) had high luminosity on day 14 and higher chromacity and saturation on day 0. The samples that presented less difference of color respect to the pasteurized milk were the U-10 and HU-15 (Homogenized-Termoultrasonicated-15 min.) and with the control the HU-10. The termoultrasonicated samples and the control had positive values on alkaline phosphatase. However, in total count the treated samples on day 0, were within the Mexican Official Norm (≤ 5 Log CFU/mL), except the HU-10, while enterobacteria only the HU-15 (1 Log CFU/mL), on day 14 the U-15 milk showed less content in total count followed by U-10, while enterobacteria the minor was HP and HU-15. It is worth highlighting that all termoultrasonicated samples have a decreased of AF content, being the U-10 which showed a lower content (149.99 AFEM₁ pg/mL), even below the pasteurized sample. Finally, in antioxidant activity on day 0, the treated samples presented higher antioxidant content, except on ABTS/AAE (Ascorbic acid equivalent) and DPPH. On day 14 the antioxidant capacity by ABTS/AAE, DPPH and FRAP increased in the HU-15, U-15 and HU-10, respectively. These results could indicate that

the application of termoultrasound represents a good alternative for the processing of milk, since in addition to decrease the microbial and AF content, can conserve the nutritional quality.

Key words: milk, termoultrasound, aflatoxins, storage

3 MARCO TEÓRICO

La leche cruda de vaca, es definida como la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro y sin substracción alguna de sus componentes, que no ha sido sometida a tratamientos térmicos (NMX-F-700-COFOCALEC-2012).

3.1 Consumo de leche a nivel mundial, nacional y estatal

Diversos factores han ocasionado que el consumo de leche disminuya a nivel mundial, tales como la recomendación de disminuir el contenido de triglicéridos, y ácidos grasos de los productos de origen animal. Además, los mercados internacionales de los productos lácteos tienen poca actividad, ya que no se comercializa más que alrededor del 7% de la producción mundial de leche, debido a que su carácter perecedero da a entender que la mayor parte de la que se consume en forma líquida se produce y elabora cerca del punto de consumo. Además, el acceso limitado a los mercados restringe considerablemente el comercio (FEN y FINUT, 2015).

La recomendación diaria de leche son dos vasos al día (200-250 mL), siendo el consumo recomendado anual de 170 L por persona, de acuerdo a la FAO en el 2017 a nivel mundial el consumo de leche líquida *per cápita* fue el siguiente:

- Elevado (> 150 kg *per cápita/año*): América del Norte, Argentina, Armenia, Australia, Costa Rica, Europa, Israel, Kirguistán y Pakistán.
- Medio (30-150 kg *per cápita/año*): India, Japón, Kenia, México, Mongolia, Nueva Zelanda, República Islámica de Irán, África septentrional y meridional, la mayoría del Oriente Próximo y la mayor parte de América Latina y Caribe.
- Bajo (< 30 kg *per cápita/año*): China, Etiopía, la mayoría de África central y gran parte de Asia oriental y sudoriental.

En México el consumo *per cápita* en 2016 fue de 53.9 L por persona (FAO, 2017).

La Unión Europea, Estados Unidos, India, China, Rusia y Brasil, son los principales productores de leche a nivel mundial con 149,000; 94,710; 68,000, 38,000; 29,890 y 27,100 miles de toneladas, respectivamente. En México en 2016 se produjeron 11,607 millones de litros de leche bovina, destacando Jalisco (2,228,482), Coahuila (1,411,959), Durango (1,113,982) y Chihuahua (1,051,731) miles de litros (Figura 1). En el estado de Hidalgo la producción anual en 2015 fue de 423,627 y para 2016 de 423,965 litros (SIAP-SAGARPA, 2016).



Figura 1 - Regiones con mayor producción de leche en México.

3.2 Importancia nutricional de la leche

La leche se sintetiza fundamentalmente en la glándula mamaria, pero una parte de sus constituyentes también proviene del suero de la sangre (García y Panadero, 2012). Está constituida por grasas, proteínas, lactosa, vitaminas, minerales y agua, además de otras sustancias que están presentes en menor concentración (FAO, 2017). El valor

energético de la leche está dado por el contenido de grasa, cada 245 mL de leche entera, semidescremada y descremada aportan 148, 116 y 86 Kcal, respectivamente (Pérez-Lizaur *et al.*, 2014).

Los lípidos están presentes entre un 3.4 y 5.1%, se encuentran emulsionados en forma de microglóbulos de 2-8 μm de diámetro, rodeados de una doble membrana de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y espingomielina) y proteínas (Vásquez-Mazo, 2015). La proporción de lípidos en leche de vaca se muestra en la Tabla 1 donde destacan los triglicéridos, presentes en un 98%, y el resto como di y monoglicéridos (Badui, 2013). Además, contiene fosfolípidos en una concentración de 30 a 50 mg/100 mL, y su importancia nutricional radica en su papel emulsionante y micelar de la propia grasa láctea. El contenido de colesterol puede ser de 14, 9 y 2 mg/100 mL, en leche entera, semidescremada y descremada respectivamente (Mataix y Rivas-Gonzalo, 2013).

Tabla 1 – Contenido de lípidos en la leche

	Porcentaje del total de lípidos	Concentración (g/L)
Triacilglicéridos	96-98	31
Diacilglicéridos	2.10	0.72
Monoacilglicéridos	0.08	0.03
Fosfolípidos	1.10	0.35
Ácidos grasos libres	0.20	0.08
Colesterol	0.45	0.15

Badui, 2013.

La concentración de ácidos grasos de cadena corta, así como de cadena media, es relativamente elevada en la leche de vaca (10-15%), lo que la diferencia del resto de las grasas comestibles. Dentro del perfil de ácidos grasos (Tabla 2) destaca su riqueza en ácidos grasos saturados como el ácido láurico, mirístico y palmítico (García *et al.*, 2015).

Tabla 2 - Perfil de ácidos grasos de la leche

Clasificación	Nombre	Contenido (%)	
Ácidos grasos	Butírico 4:0	3.6	
	Caproico 6:0	2.5	
	Caprílico 8:0	1.5	
	Cáprico 10:0	3.6	
	Saturados	Láurico 12:0	4.8
	Mirístico 14:0	12.4	
	Pentadecanoico 15:0	1.4	
	Palmítico 16:0	35.7	
	Esteárico 18:0	9.1	
	Monoinsaturados	Miristoleico 14:1	1.3
		Palmitoleico 16:1	2.5
		Oleico 18:1	15.2
	Poliinsaturados	Linoleico 18:2	2.1
		Linolénico 18:3	0.7
Ramificados, hidroxilados y otros		3.6	

Badui, 2013.

Además la leche contiene proteínas de alto valor biológico que se encuentran divididas de acuerdo a su estado de dispersión, en caseínas (80%) y seroproteínas o proteínas del suero (20%) (Tabla 3) (Vásquez-Mazo, 2015).

Las caseínas están formadas por un complejo de fosfoproteínas y glicoproteínas que están en suspensión coloidal como micelas estables (Figura 2), no coagulan a altas temperaturas (100 °C), pero si a un pH bajo (4.65). Se pueden encontrar diferentes fracciones como α , κ y β -caseínas que incluyen distintos componentes como calcio, fosfato y citrato, los cuales dan estabilidad a la micela. Mientras que entre las seroproteínas destacan la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y otras en menor proporción, como inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa (Pingret *et al.*, 2013).

Tabla 3 - Distribución de las proteínas de la leche

Tipo	Nombre	Total de proteínas (%)	Total de aminoácidos
Caseínas (80%)	α s1	34	199
	α s2	8	207
	β	25	209
	κ	9	169
	γ	4	5.8
Proteínas del suero (20%)	β -lactoglobulina	9	162
	α -lactalbúmina	4	123
	Proteosa peptona	4	
	Inmunoglobulinas	2	
	Seroalbúmina	1	

Badui, 2013

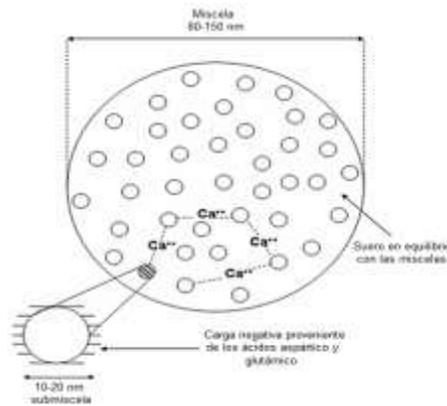


Figura 2 - Estructura de la micela de caseína y sus subunidades (Badui, 2013).

Las enzimas como lipasa, proteasa, fosfatasa alcalina, catalasa, lactoperoxidasa, etc., se encuentran en baja concentración unidas a la membrana del glóbulo graso y son sintetizadas en la glándula mamaria (García *et al.*, 2014). El hidrato de carbono más importante es la lactosa (40-50 g/L), siendo su función principal la energética, aunque existen otros azúcares en pequeñas cantidades (mg o μ g/100 mL) como glucosa, galactosa, aminoazúcares, azúcares fosforilados, entre otros (Mataix y Rivas-Gonzalo, 2013). Las vitaminas de la leche provienen de la alimentación de la vaca y de su síntesis por parte de las bacterias del rumen, siendo en la estación de verano cuando la

riqueza vitamínica es mayor. Pueden encontrarse vitaminas hidrosolubles como tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃) y en menor proporción ácido fólico, también contiene vitaminas liposolubles como la vitamina A en forma de retinol y vitamina E (Badui, 2013). La leche contiene distintos minerales, principalmente calcio, hierro, fósforo, magnesio, potasio y zinc (Mahaut *et al.*, 2003).

3.2.1 Antioxidantes en la leche

Se han estudiado algunos compuestos bioactivos con actividad antioxidante, tal es el caso de proteínas del suero como la lactoferrina y α -lactoalbúmina, que actúan como agentes quelantes de metales, también en la lactoperoxidasa, lisozima y β -lactoglobulina se ha demostrado efectos sobre los radicales libres (Power *et al.*, 2012). Por otro lado, las caseínas y los péptidos derivados de las caseínas pueden inhibir la peroxidación lipídica, además los caseinfosfopéptidos, derivados de la hidrólisis de caseína, actúan como péptidos secuestradores de metales (Bucevic-Popovic *et al.*, 2014). Algunos compuestos antioxidantes como los fenoles pueden estar presentes en la leche, estos provienen principalmente de la alimentación de la vaca siendo en las estaciones de primavera y verano donde hay mayor cantidad de estos (O'Connel y Fox, 2001).

3.3 Especificaciones de la leche

Las especificaciones sanitarias en leche cruda, semidescremada y descremada están establecidas en Normas Oficiales de la Secretaría de Salud y son de gran importancia ya que establecen las características microbiológicas y fisicoquímicas que debe presentar para ser apta para el consumo humano sin que represente un riesgo a la salud de los consumidores (Tabla 4).

Tabla 4 – Especificaciones fisicoquímicas y sanitarias de la leche

Parámetro	Especificación
Densidad a 15 °C, g/mL	1.029 mín.
Grasa butírica g/L	30 mín.
Acidez (expresada como ácido láctico) g/L	1.3 mín.
	1.7 máx.
Sólidos no grasos de la leche, g/L	83 mín.
Lactosa g/L	43 mín.
	52 máx.
Proteínas propias de la leche g/L	30 mín.
Caseína g/L	24 mín.
Aflatoxina M ₁ µg/kg	0.5 máx.
Cuenta total de Bacterias Mesofílicas Aerobias UFC/mL	< 100,000

NOM-155-SCFI-2012 ; NMX-F-700-COFOCALEC-2012

3.3.1 Aflatoxinas

El término “aflatoxina” fue acuñado a comienzos del decenio de 1960, cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos, murieron a causa de una enfermedad conocida como “enfermedad X de los pavos”, y se atribuyó a la presencia de toxinas de *Aspergillus flavus* en harina de maní importada de Sudamérica (Zain, 2011).

Las aflatoxinas (AF) son producidas por cepas de hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, aunque también pueden ser producidas por hongos del género *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* y *Alternaria* (Steyn y Stander, 1999). Estos requieren ciertas condiciones para llevar a cabo su crecimiento las cuales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 - Condiciones ambientales para el crecimiento de hongos productores de aflatoxinas

Hongo	Temperatura	pH	Actividad de agua (a _w)	Humedad relativa
<i>A. flavus</i>	13-37 °C (óptima 16-31 °C)	2-8 (óptimo 6)	0.82-0.99 (óptimo 0.95-0.99)	> 14%
<i>A. parasiticus</i>	12-40 °C (óptima 25 °C)	2-8 (óptimo 6)	0.86-0.99 (óptimo 0.95)	> 14%

Herrera, 2012; Bhat, Rai y Karim, 2010

Estas micotoxinas pertenecen a la familia de las bifurano-cumarinas, entre ellas se encuentra la aflatoxina M₁, un producto hidroxilado derivado de la aflatoxina B₁ (AFB₁) durante el metabolismo oxidativo (Figura 3), constituida por la fusión de un núcleo cumarínico, bifurano y una pentanona (Urrego y Díaz, 2006).

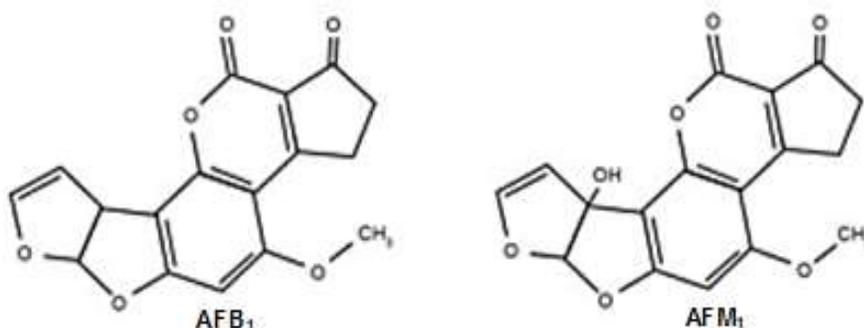


Figura 3 - Estructura química de las aflatoxinas (Carvajal, 2013)

La aflatoxina M₁ es producida después de que el ganado lechero consume granos contaminados con AFB₁. Esta última es absorbida en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad (Barquero, 2009), después pasa al hígado donde es biotransformada por enzimas microsomales, como la CYP1A2, que en su mayoría forma endo-epóxido y AFM₁, una vez formada se excreta en la orina y en la leche del animal (Bañuelos *et al.*, 2000).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) designaron a la aflatoxina B₁ como la más tóxica y como un compuesto cancerígeno (Bakirci, 2001). Sin embargo, todas las aflatoxinas tienen efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos (El-Sayed y Khalil, 2009), además juegan un papel importante en la elevada incidencia de carcinoma hepatocelular humano en ciertas áreas del mundo (EFSA, 2012).

3.3.2 Presencia de aflatoxinas en leche

La leche es un alimento con un alto valor nutritivo pero también susceptible de contaminación y principal vehículo de introducción de AFM₁ en la dieta, lo que representa un riesgo para la salud pública (Quevedo-Garza *et al.*, 2015) debido a que los tratamientos térmicos convencionales como la pasteurización y la esterilización en autoclave no han sido capaces de destruirla, por lo que pueden estar presentes también en derivados lácteos (Park, 2002).

Carvajal *et al.*, (2003) y Pérez *et al.*, (2008) reportan la presencia de AFM₁ en leche en polvo y fluida comercializadas en el estado de Hidalgo y en el Altiplano Mexicano. Para 2010 Urbán *et al.*, realizaron un estudio en leche y queso de cabra, recolectaron muestras en cinco unidades de producción caprina del estado de Hidalgo, durante el período comprendido de julio 2008 a junio de 2009 y, se encontró la presencia de AFM₁ en el 30% de las muestras analizadas. Los niveles de contaminación variaron en los diferentes meses, y la mayor frecuencia se encontró en el mes de marzo y octubre (0.87 µg/kg), pero sólo el 8.3% del total de las muestras presentaron niveles por arriba de la norma 184-SSA1-2002 (0.05 µg/kg). Finalmente, estudios realizados por Velásquez *et al.*, (2012) en el estado de Jalisco mostraron contaminación por AFM₁ en leche en el 100% de las muestras, las cuales consistieron en la recolección de leche cruda de 10 centros de acopio y 6 marcas de leche pasteurizada. En general, en México, existe poca información sobre la contaminación por AFM₁ en leche (López *et al.*, 2012), ya que la mayoría de los estudios se han limitado a registrar la incidencia de *Aspergillus*,

cuantificación de aflatoxinas B₁ e identificación a nivel de género de los hongos presentes en el grano de maíz (Hernández-Delgado *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2012).

Lo anterior, pone en evidencia que la presencia de AFM₁ en leche es una problemática actual en México, debido a la relevancia en la salud pública, particularmente por la carcinogenicidad demostrada en humanos, lo cual hace necesario implementar medidas para prevenir el consumo de alimentos contaminados con estas micotoxinas. Se han utilizado diferentes métodos para disminuir la concentración de AF, como extracción con solventes, adsorción, calentamiento, irradiación, luz ultravioleta, rayos gamma e irradiación solar (Rustom, 1997). Sin embargo, por si solos, ninguno ha logrado una total eliminación.

3.4 Procesamiento de la leche

Para asegurar la calidad microbiológica de la leche y evitar que represente un riesgo para la salud de la población, existen métodos térmicos convencionales para tratarla como la pasteurización, esta incluye el uso de temperatura ultra alta (UHT), baja temperatura tiempo largo (LTLT) y alta temperatura tiempo corto (HTST) (Capilla, 2015).

Previo a dichos tratamientos, se requieren procesos como el desnatado y homogenización. El proceso de desnatado se utiliza para eliminar parte de la grasa logrando que tenga un contenido aproximado de 3.5-4.0%, lo cual favorece la estabilidad de la leche que será destinada para consumo o elaboración de derivados lácteos (NMX-F-700-COFOCALEC-2012). La homogeneización se emplea en la industria para estabilizar los lípidos de la leche y evitar la separación de fases, esta se pasa a través de una válvula con una abertura muy pequeña, donde los glóbulos originales se desintegran en un gran número de ellos de menor tamaño (2 µm). Este proceso no sólo rompe los glóbulos de grasa, sino que provoca una interacción lípido-

proteína donde el suero y otras proteínas se unen a la membrana del glóbulo graso mediante enlaces hidrófobos y las inmunoglobulinas a la caseína *k* (Badui, 2013).

3.4.1 Pasteurización rápida

El proceso de pasteurización original se desarrolló para destruir al *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, y consistía en calentar la leche a 61.5 °C por 30 min. Sin embargo, en estas condiciones sobrevive la *Coxiella burnetii*, que es el patógeno más termorresistente que crece en la leche. Actualmente, se lleva a cabo en sistemas continuos de intercambiadores de calor de placas o de tubos, en los que la leche se somete a 71.8 °C durante 15 segundos de tratamiento efectivo (Mataix y Rivas-Gonzalo, 2013).

La pasteurización está calculada en la reducción de 12 ciclos logarítmicos de la cuenta microbiana de la *C. burnetii*, y eliminación microorganismos más termosensibles como los coliformes, además la inactivación de la fosfatasa alcalina, sin embargo no elimina esporas, peroxidasa, lipasas, proteasas, ni bacterias lácticas, por lo que requiere de refrigeración, ya que su vida útil es de 7 días aproximadamente (Badui, 2013).

La eficiencia de la pasteurización se valida indirectamente al medir la actividad residual de la fosfatasa alcalina, ya que su inactivación indica que el tratamiento térmico fue efectivo; sin embargo durante el almacenamiento se puede presentar su reactivación (Santos, 2012).

Este tratamiento ha sido ampliamente utilizado en la industria del procesamiento de los alimentos, por su efecto sobre la reducción de microorganismos, sin embargo, también existe un efecto negativo sobre los nutrientes termosensibles como las vitaminas (tiamina, folatos, cobalamina y riboflavina) (Chambers *et al.*, 2010).

3.4.1 Pasteurización lenta o discontinua

La leche se calienta por medio de vapor o agua caliente, que circula entre las paredes de un tanque de acero inoxidable a 63 °C durante 30 min., usando un agitador para hacer más homogéneo el tratamiento. Una vez alcanzada la temperatura, es enfriada a menos de 10 °C por medio de una corriente de agua fría. La ventaja de este método es que mantiene el mismo valor nutricional de una leche sin tratamiento, pero tiene un efecto germicida menor al exigido para leches pasteurizadas (Capilla, 2015).

3.4.2 Leche ultrapasteurizada (UHT)

La ultrapasteurización es un tratamiento más intenso (145-155 °C durante 1-5 segundos) que destruye prácticamente todos los microorganismos y las enzimas más termorresistentes. El producto obtenido puede almacenarse sin refrigeración por periodos de hasta 4-6 meses, siempre y cuando no se abra el envase. Sin embargo una de las desventajas de las elevadas temperaturas utilizadas, es la desnaturalización de proteínas lo cual es indeseable en leches que son destinadas para la elaboración de quesos (Pérez-Reyes y Sosa-Morales, 2013).

Debido a lo anterior y a la creciente demanda de alimentos saludables, el aumento del poder adquisitivo de productos y la mayor disponibilidad de estos en el mercado, la industria de los alimentos se ha visto obligada a desarrollar nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos, que logren cubrir las expectativas nutricionales y sociales de la población y que además permita aumentar la variedad, cantidad y calidad de estos productos (Santos, 2012). Como se mencionó anteriormente los tratamientos tecnológicos convencionales no logran disminuir la concentración de las aflatoxinas, por lo que una de las alternativas para solucionar esta problemática podría ser el uso del ultrasonido.

3.5 Ultrasonido

La tecnología de ultrasonido puede definirse como ondas mecánicas a frecuencias por arriba del umbral del oído humano (> 16 kHz). Las ondas viajan a través del material o sobre la superficie (Soria y Villamiel, 2010).

El ultrasonido se puede dividir en diferentes rangos de frecuencia, ultrasonido de alta frecuencia/baja intensidad (100 kHz–1 MHz), con niveles de intensidades menores a 1 W cm^{-2} , genera bajos niveles de potencia (Knorr *et al.*, 2004), de modo que el material tratado no se altera física o químicamente (Romero *et al.*, 2016). Generalmente, este tratamiento no es destructivo, se ha utilizado con éxito para el control no invasivo de los procesos alimenticios y como una técnica analítica para determinar las propiedades fisicoquímicas de los alimentos como la textura, densidad, porosidad, tamaño de grano, etc., (De São José *et al.*, 2014).

El ultrasonido de baja frecuencia/alta intensidad (16 – 100 kHz), en donde los niveles de potencia utilizados son de $10 - 1000 \text{ W cm}^{-2}$, pueden llegar a modificar el material estudiado, dañando sus propiedades e incluso originar una reacción química con el fin de liberar el compuesto buscado (Ulloa *et al.*, 2013) y se ha utilizado en la fabricación de alimentos para la desintegración celular, extracción de componentes intracelulares y enzimas, aceleración de reacciones enzimáticas, fermentación microbiana, la dispersión de polvos secos en líquidos, la emulsificación, la desactivación de enzimas y microorganismos, etc., (De São José *et al.*, 2014). Este tratamiento se basa fundamentalmente en el fenómeno de cavitación (Figura 4) (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Durante el procesamiento, cuando una onda sónica se encuentra con un medio líquido se forman ondas longitudinales, creando así regiones de compresión y expansión alternadas (Sala *et al.*, 1995), estas regiones de cambio de presión provocan la cavitación formando burbujas de gas en el medio, lo que aumenta la difusión de gas, haciendo que la burbuja se expanda alcanzando un punto en el que la energía ultrasónica proporcionada no es suficiente para retener la fase de vapor en la burbuja;

por lo tanto, se produce una rápida condensación. Las moléculas condensadas, alcanzan temperaturas de hasta 5,500 °C y 50,000 kPa, y chocan violentamente con las estructuras químicas del material estudiado, causando su ruptura y modificación de estructuras (Aday *et al.*, 2012). Los cambios de presión resultantes de estas implosiones son el principal efecto bactericida en el ultrasonido (Piyasena *et al.*, 2003).

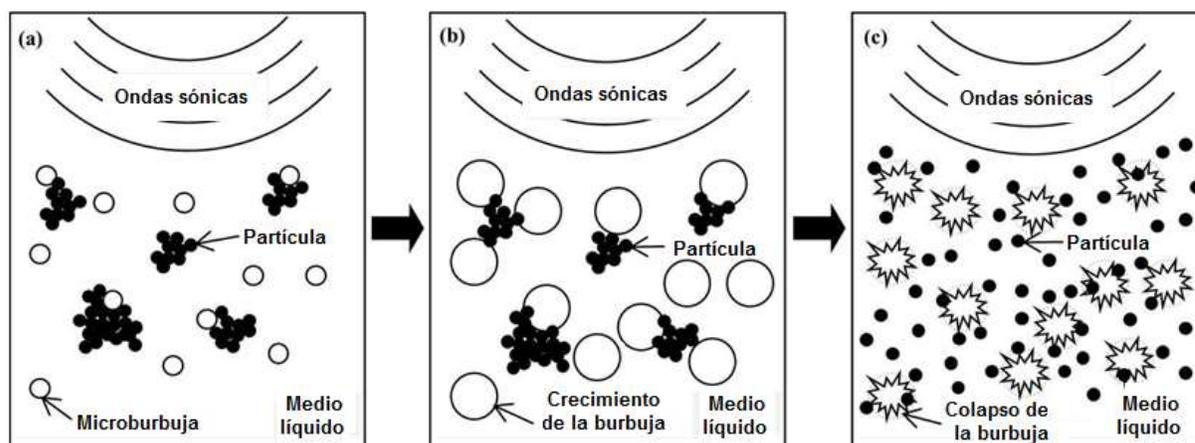


Figura 4 - Etapas del fenómeno de cavitación (Abdullah y Chin, 2004)

Este método ha sido utilizado para la conservación de alimentos, demostrando su eficacia en la descontaminación de vegetales crudos y de huevos enteros sumergidos en medios líquidos (Kentish y Feng, 2014). Además se ha demostrado una disminución significativa de *Escherichia coli* en jugo de tuna (Cruz-Cansino *et al.*, 2016) así como de *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes* en jugo de manzana, esto sin alterar el contenido de proteína y caseínas (Gabriel, 2012). También el ultrasonido ha facilitado la extracción de compuestos antioxidantes (Zafra-Rojas *et al.*, 2016).

El ultrasonido hace uso de fenómenos físicos y químicos que son fundamentalmente diferentes a los que se aplican convencionalmente en las técnicas de extracción, procesamiento y conservación. Ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, ya que se obtienen mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y físicos y se considera ambientalmente amigable.

Actualmente es considerada una técnica de procesamiento sustentable, debido a que típicamente emplea menos tiempo, agua y energía (Chemat y Khan, 2011).

3.5.1 Termoultrasonido

El efecto de los ultrasonidos sobre los agentes alterantes de los alimentos es limitado y dependiente de múltiples factores (tipo de alimento, tiempo de exposición del tratamiento, entre otros), por ello, su aplicación se ha encaminado hacia la combinación, simultánea o alterna, con otras técnicas de conservación (Wilches, 2015), para la destrucción o eliminación de microorganismos, además puede usarse para mejorar la esterilización proveniente de un tratamiento térmico (Mason *et al.*, 1996). La aplicación de ultrasonido y tratamientos térmicos suaves (entre 50 y 60 °C) ha dado lugar al procedimiento denominado termoultrasonificación (Figura 5) (Herrero y Romero, 2016).

El primer reporte sobre la sinergia entre el ultrasonido y el calor como mecanismo para inactivar bacterias fue publicado por Ordóñez *et al.* (1987), ellos combinaron las ondas ultrasónicas de alta potencia con temperatura, obteniendo que los efectos de la inactivación de microorganismos (*Staphylococcus aureus*) fueron mayores que en los efectos de las ondas ultrasónicas a temperatura ambiente. García *et al.*, (1989), mostraron los beneficios de la termosonicación para la disminución de las esporas de *Bacillus subtilis*, mencionaron que a pesar de que el efecto de la cavitación podría ser minimizado por el aumento de la temperatura, en el caso de la leche, la concentración de sólidos en suspensión podría desempeñar un papel importante y mejorar la intensidad de la cavitación. También observaron que a elevadas temperaturas, el efecto de la termosonicación para destruir bacterias se mantuvo en la leche, además comparada con la destrucción térmica, los resultados fueron muy similares. Aunque el mecanismo no está claro, atribuyeron estos resultados a la concentración de sólidos presentada en la leche. En un estudio publicado por Wringley y Llorca (1992), en la disminución de *Salmonella typhimurium* en leche descremada y huevo en una infusión cerebro/corazón contaminada con dicha bacteria, se observó una reducción de la

contaminación del 99%, aplicando ultrasonido a temperaturas moderadas (por debajo de las utilizadas en la pasteurización).

Aunque se conoce el efecto bactericida del ultrasonido, especialmente cuando se combina con calor (García *et al.*, 1989) y que tiene ventaja sobre la utilización de la pasteurización, ya que además de la disminución microbiana, puede minimizar la pérdida de sabor y obtener mayor homogeneidad (Thaipong *et al.*, 2006) la industria láctea no utiliza actualmente esta técnica para propósitos de conservación. Esto podría deberse a que los estudios detallados, incluyendo los aspectos de consumo de energía, sobre el procesamiento de leche ultrasonicada son escasos (Villamiel y De Jong, 2000). Sin embargo, existe evidencia de los efectos del ultrasonido sobre la reducción de microorganismos en leche, jugo y otros alimentos, pero no sobre los efectos en la concentración de las aflatoxinas en leche.

Estudios han reportado (Mohammad *et al.*, 2015) que el poder del ultrasonido para la disminución de la toxicidad de las aflatoxinas, radica en la pérdida de uno de los dobles enlaces del anillo furano o la pérdida del mismo por acción de la cavitación. Por lo que posiblemente al aplicar este tratamiento se pueda disminuir la concentración de la AFM₁, además de evitar la pérdida de sus propiedades nutricionales.

4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Tanto a nivel mundial como en México, existe una problemática actual en salud pública por contaminación de alimentos, como en el caso de la leche de vaca que puede presentar aflatoxina M₁, compuesto capaz de provocar daño hepático y efectos cancerígenos, dicha contaminación se debe a que el ganado lechero consume alimentos contaminados con aflatoxina B₁, este proceso se inicia desde la alimentación del animal, por las condiciones de higiene con las que se transporta o almacena el alimento. En México, desde el 2003 se reportó la presencia de aflatoxina M₁ en diferentes centros de acopio, e incluso en leche comercial, sin embargo, en este alimento no existen estudios recientes sobre la presencia de contaminación por aflatoxina, ya que la mayoría de los estudios se ha enfocado en identificar la micotoxina en granos de maíz. Además el problema ha ido en aumento, ya que existen pocos laboratorios y plantas de tratamiento que evalúen la calidad de los productos lácteos, que permitan asegurar la disminución de la presencia de dichos contaminantes de acuerdo al límite marcado por la normatividad (0.05 µg/kg).

5 JUSTIFICACIÓN

La leche es el producto lácteo más consumido a nivel mundial, por ello su contaminación con aflatoxina M₁ representa una problemática en la salud, además las tecnologías convencionales como la pasteurización, ultra-pasteurización o esterilización, no garantizan su disminución o eliminación, por tal motivo se requiere de la aplicación de tratamientos que aseguren inocuidad y que además mantengan la calidad de la leche. Existen nuevas tecnologías emergentes en las que se ha encontrado que no causan daño o lo hacen mínimamente sobre las características sensoriales y nutricionales del alimento, entre ellas se encuentra el termoultrasonido, ya que se ha demostrado su efecto bactericida, así como liberación de compuestos antioxidantes, aunado a esto podría sustituir la homogenización y/o pasteurización en la industria, mejorando su calidad fisicoquímica, microbiológica y nutricional, por lo que podría ser una alternativa para disminuir la concentración de aflatoxina M₁ en la leche.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto del termoultrasonido sobre la composición fisicoquímica, capacidad antioxidante, contenido de microorganismos e inactivación de aflatoxinas en leche durante el almacenamiento, para asegurar la calidad nutricional e inocuidad del producto lácteo.

6.2 Objetivos específicos

- Aplicar el tratamiento por termoultrasonido en diferentes condiciones para comparar las características de las leches tratadas, la pasteurizada y la leche sin tratamiento.
- Determinar la composición química proximal de la leche mediante la medición del porcentaje de proteínas, grasa, carbohidratos, humedad y minerales.
- Analizar las propiedades fisicoquímicas de la leche midiendo pH, acidez, densidad, sólidos totales, sólidos no grasos, estabilidad, fosfatasa alcalina, color para comparar los cambios durante el almacenamiento.
- Determinar la calidad microbiológica a través del conteo de mesófilos aerobios y enterobacterias en leche para comparar la reducción de microorganismos entre las leches tratadas y la leche sin tratamiento y los cambios durante el almacenamiento.
- Realizar la medición del contenido de aflatoxinas M₁ libres en la leche mediante la prueba ELISA para comparar la concentración de este compuesto entre las leches tratadas y la leche sin tratamiento y los cambios producidos durante el almacenamiento.
- Evaluar el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante mediante ABTS, DPPH y FRAP en leche para comparar su concentración en las leches tratadas y la leche sin tratamiento.

- Comparar los cambios que se produjeron durante el almacenamiento en las propiedades fisicoquímicas, microbiología, contenido de aflatoxinas y de antioxidantes en leche tratada con termoultrasonido, leche pasteurizada y sin tratamiento.

7 DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Obtención de la muestra

La leche utilizada se obtuvo del Rancho Universitario del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo, en el municipio de Tulancingo de Bravo. Se recogió en frascos de vidrio previamente esterilizados y se trasladó a 12 °C. La leche fue sometida a 6 tipos de tratamientos (Tabla 6). Se llevaron a cabo 20 determinaciones para la evaluación de análisis químico proximal y las características fisicoquímicas, microbiológicas y antioxidantes de las muestras (Figura 6).

Tabla 6 - Muestras de estudio

Clave	Tipo de muestra
CL	Leche Control
U-10	Leche Termoultrasonificada – 10 min.*
U-15	Leche Termoultrasonificada – 15 min.*
HU-10	Leche Homogenizada – Termoultrasonificada – 10 min.*
HU-15	Leche Homogenizada – Termoultrasonificada – 15 min.*
HP	Leche Homogenizada – Pasteurizada

*: 95% de amplitud empleada en termoultrasonido

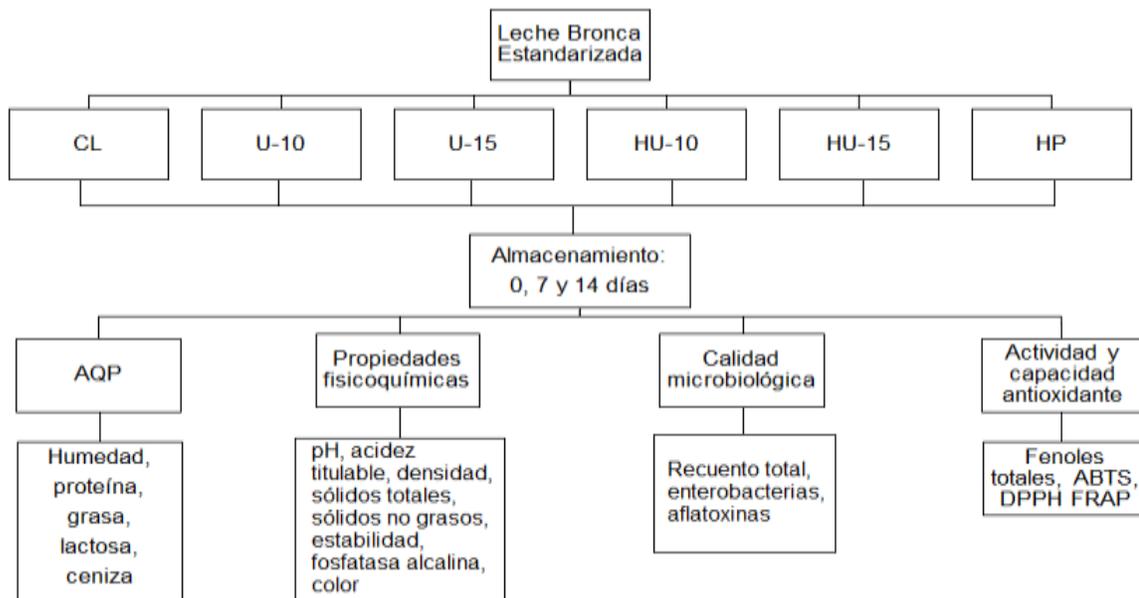


Figura 5 - Diagrama del diseño metodológico. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada.

7.2 TIPO DE ESTUDIO

Se analizaron 20 variables: análisis químico proximal (humedad, proteína, grasa, lactosa y cenizas), pH, acidez titulable, densidad, sólidos totales (ST), sólidos no grasos (SNG), estabilidad física, fosfatasa alcalina, color, calidad microbiológica (mesófilos aerobios y enterobacterias), conteo de aflatoxinas, actividad antioxidante (compuestos fenólicos totales) y capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP). Posteriormente se realizó una comparación entre los tratamientos aplicados, la leche pasteurizada y el control a lo largo del almacenamiento entre cada muestra y entre muestras a través de los días.

7.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de leche fueron sometidas a tratamiento de homogenización, tratamiento por termoultrasonido en diferentes condiciones y pasteurización, así como una muestra control para su posterior comparación.

7.3.1 Homogenización

El proceso de homogenización se llevó a cabo con la finalidad de reducir el tamaño del glóbulo de grasa de la leche, se usó un homogeneizador digital (Ultra Turrax, IKA®, Korea) colocando 200 mL de leche en frascos bacteriológicos estériles de 500 mL y fue sometida a 11,000 rpm por 5 min.

7.3.2 Pasteurización

La pasteurización se realizó en 400 mL de leche homogenizada a 85 °C durante 15 s según la metodología descrita por Juraga *et al.*, (2011) en un recipiente de acero inoxidable de doble pared a través de la cual circulaba agua en un baño de recirculación (1210610, Cole Parmer, EE. UU) con temperatura controlada a 87 °C a una velocidad de flujo de 0.5 L/min.

7.3.3 Termoultrasonido

El tratamiento de termoultrasonido se llevó a cabo en un procesador ultrasónico (VCX 1500 HV, Sonics & Materials, Inc. Newtown, EE.UU) (Figura 6) con una sonda de 13 mm de diámetro. Las muestras se procesaron a una frecuencia constante de 20 kHz durante períodos de tiempo de 10-15 min., en leche homogenizada y sin homogenizar con duraciones de pulso de 4 s on y 2 s off. Se colocaron 400 mL de muestra en un recipiente de acero inoxidable de doble pared a través del cual circulaba agua a 45 °C circulaba a una velocidad de flujo de 0.5 L/min. (1210610, Cole Parmer, EE.UU). Durante los tratamientos se monitoreo la temperatura de entrada y salida (Tabla 7).

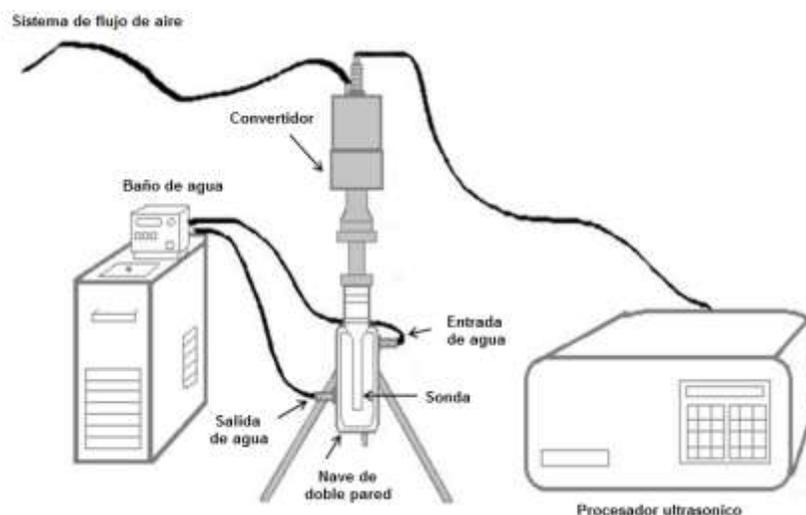


Figura 6 - Equipo de termoultrasonido (Zafra-Rojas et al., 2016)

Tabla 7 - Temperatura inicial y final de las diferentes muestras después del tratamiento

Muestras	CL	U-10	U-15	HU-10	HU-15	HP	
T	T ¹	8	31 ± 3.61	31 ± 2.65	30 ± 3.00	29 ± 3.61	8
(°C)	T ²	-	48.27 ± 2.89	54.87 ± 1.42	50.20 ± 0.40	55.07 ± 0.40	85

T: Temperatura. T¹: Temperatura inicial. T²: Temperatura final. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada

7.4 Almacenamiento

Después del tratamiento correspondiente, todas las muestras, fueron almacenadas en congelación a -32 °C para la determinación de antioxidantes, y el resto en refrigeración a 8 °C en frascos y viales eppendorf previamente estériles, y se analizaron transcurridos 0, 7 y 14 días de su obtención.

7.5 Determinación del análisis químico proximal (AQP).

La composición química proximal se llevó a cabo con el equipo LACTOSCAN (MCC, Milkotronic Ltd, Bulgaria), utilizando 30 mL de cada una de las muestras de leche a

temperatura ambiente. Los parámetros medidos fueron: lactosa, proteína, cenizas y grasa. La humedad se calculó por diferencia como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = 100 - \text{lactosa} - \text{proteína} - \text{cenizas} - \text{grasa} \quad \text{Ecuación 1}$$

7.6 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

7.6.1 Determinación del pH

La medición de pH se realizó con un potenciómetro (pH210, Hanna Instruments, Romania) en 30 mL de leche.

7.6.2 Determinación de la acidez titulable

La acidez se determinó por el método de la AOAC (942.15, 1999). La prueba se llevó a cabo colocando 9 mL de muestra más 5 gotas de fenolftaleína en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se tituló con solución de NaOH 0.1 N hasta que la muestra tomó un color ligeramente rosa. El porcentaje de acidez titulable se calculó con la siguiente ecuación registrando los mL de NaOH gastados:

$$\% \text{ acidez titulable} = \frac{(V \times N \times 0.09)}{V_m} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

V: mililitros de NaOH gastados

N: normalidad del NaOH de 0.1

V_m: mililitros de muestra utilizados

7.6.3 Determinación de la densidad, sólidos totales y sólidos no grasos

La gravedad específica se llevó a cabo colocando 250 mL de leche en una probeta de vidrio, midiendo la temperatura, posteriormente se sumergió el lactodensímetro y se registró la lectura (Kirk *et al.*, 2011). Para corregir la lectura del lactodensímetro, por cada grado centígrado por arriba de 15 °C se sumó 0.24 y por cada grado por debajo se restó 0.24 a la lectura del lactodensímetro. La densidad se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Gravedad Específica} = \left(\frac{\text{lectura corregida}}{1000} \right) + 1 \quad \text{Ecuación 3}$$

Los sólidos totales y sólidos no grasos se calcularon a partir de la lectura corregida y el porcentaje de grasa de la leche con las siguientes ecuaciones (Kirk *et al.*, 2011):

$$\% \text{ Sólidos totales} = \left(\frac{\text{lectura corregida}}{4} \right) + (1.2 \times \% \text{ grasa}) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\% \text{ Sólidos no grasos} = \left(\frac{\text{lectura corregida}}{4} \right) + (0.2 \times \% \text{ grasa}) \quad \text{Ecuación 5}$$

7.6.4 Determinación de índice de estabilidad física

El índice de estabilidad se valoró determinando el porcentaje de partículas sedimentadas (p/p) después de la centrifugación (Cruz *et al.*, 2007). Un valor alto de este parámetro indica una baja estabilidad como consecuencia de la sedimentación de las partículas. Se pesaron 10 mL de cada tipo de leche en tubos de polipropileno de 15 mL previamente pesados (peso inicial), los tubos fueron centrifugados (VanGuard V6500, Hamilton Bell®, USA) a 3500 rpm por 20 min., a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el sobrenadante por decantación y se registró nuevamente el peso (peso final). El porcentaje de sólidos precipitados (% p/p) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% p/p = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) \times 100$$

Ecuación 6

Dónde:

%p/p: porcentaje de sólidos precipitados

Peso inicial: peso del tubo vacío (g)

Peso final: peso del tubo con residuo (g)

7.6.5 Determinación de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa ligada a la membrana del glóbulo graso de la leche, responsable de eliminar grupos fosfatos (desfosforilación) de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides (INEN, 1973). El método se basa en la acción que ejerce la fosfatasa sobre el fosfato fenildisódico, liberando fenol, que se detecta haciéndolo reaccionar con 2,6-dicloroquinonacloroimida (CQC), para formar indofenol que produce color azul en un medio básico. La prueba se realizó con el Kit LACTOCYDEX, Lactognost®. Para comprobar la técnica se utilizó un control negativo de leche.

7.6.6 Determinación del color

La prueba se realizó en 10 mL de leche, usando un colorímetro portátil (500SM-508D, Minolta CM-80, Japón) donde se obtuvieron valores según la escala CIE $L^* a^* b^*$, donde L^* indica luminosidad que varía de 0 (blanco) a 100 (negro); a^* mide la contribución rojo-verde y b^* la contribución azul-amarillo (Francis, 1980). Para calcular cromaticidad (C) y tonalidad (h°) se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$C = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

Ecuación 7

$$h^\circ = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$$

Ecuación 8

L^* a^* b^* fueron utilizadas para calcular la diferencia de color (ΔE) utilizando las leches control (CL) y pasteurizada (HP) como referencia. La diferencia de color se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Ecuación 9

7.7 Determinación de la calidad microbiológica

7.7.1 Mesófilos aerobios y enterobacterias

El análisis microbiológico se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa haciendo una siembra por inclusión utilizando diluciones decimales con agua de peptona. El recuento de mesófilos aerobios (MA) se realizó en agar para métodos estándar, incubado a 30 °C (LSI-3016A, LabTech®, Korea), durante 48 horas y recuento de enterobacterias (EB) en agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG), incubado a 37 °C durante 24 horas en una incubadora (LSI-3016A, LabTech®, Korea) (IDF, 1991).

7.7.2 Determinación de aflatoxina M₁

Para la cuantificación de AFM₁, se llevó a cabo una centrifugación de las diferentes muestras a 3500 rpm durante 10 min., para eliminar el contenido de grasa. Posteriormente se utilizó el Kit de Euro Proxima® aflatoxina M₁ ELISA es un inmuno ensayo enzimático competitivo en fase sólida. Se utilizó una curva estándar con 100 µL de solución de AFM₁ en las siguientes concentraciones: 6.25, 12.50, 25, 50, 100 y 200 pg/mL, conjuntamente se utilizaron dos blancos de solución estándar cero (blanco A y blanco B). Los micropocillos se midieron ópticamente con un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KCjunior, EE. UU.) a una absorbancia de 450 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de aflatoxina M₁ en picogramos/mililitro (EAFM₁ pg/mL) (Anexo).

7.8 Determinación de la actividad antioxidante

7.8.1 Extracción de compuestos antioxidantes

Se llevaron a cabo siguiendo la metodología de Wallace y Giusti (2008), utilizando metanol como disolvente extractor en una proporción 1:3 (muestra:metanol), se colocaron 3 mL de cada una de las muestras y 9 mL de metanol en tubos de centrifuga de 50 mL. Los tubos se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 15 min., transcurrido este tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm en una centrifuga refrigerada (Allegra 25™, Beckman Coulter, EE. UU.) a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante de cada tubo se guardó en viales etiquetados y se congeló a -32 °C para su posterior análisis.

7.8.1.1 Contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron de acuerdo al método de Stintzing *et al.*, (2001), el cual utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu. Este reactivo es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica que ocurre en condiciones alcalinas. La coloración azul refleja la cantidad total de polifenoles presentes.

La técnica se realizó con la extracción directa colocando en viales 200 µL de la extracción, para aumentar la concentración. Se agregaron 500 µL de solución de Folin-Ciocalteu (1/10 en agua destilada) y 400 µL de solución de carbonato de sodio al 7.5%. Las muestras se agitaron en vortex, se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min y se realizó la lectura de absorbancia en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KCjunior, EE. UU.) a 765 nm. La cantidad de compuestos fenólicos totales se obtuvo a partir de una curva estándar (Anexo) preparando una solución de ácido gálico con 7.5 mg en 25 mL de agua. A partir de esta solución se realizaron las siguientes concentraciones: 0, 100, 200 y 300 mg EAG/L, posteriormente se tomaron

100 μL de cada concentración y se aplicó el método antes descrito. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L).

7.8.1.2 Ensayo ABTS^{•+}

La actividad antioxidante en base al radical libre de ABTS^{•+} se realizó de acuerdo al método descrito por Kuskoski *et al.*, (2004). El ABTS^{•+} es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul-verde, cuando este catión radical es reducido por una antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color.

Se preparó una solución de ABTS^{•+} 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM, se incubó 16 horas en refrigeración protegido de la luz. Transcurrido el tiempo, se realizó una prueba de dilución en agua destilada hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.1 . La dilución que se utilizó fue 1/15 (16.6 mL de ABTS^{•+} a 250 mL de agua). Para la técnica se tomaron 20 μL de cada extracto y 980 μL de la dilución de ABTS^{•+}, se dejó reposar 7 min y posteriormente se realizó la lectura espectrofotométrica a 754 nm en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KCjunior, USA). Se utilizó una curva estándar (Anexo) para la cual se preparó una solución con 0.375 mg de TROLOX en 5 mL de etanol. A partir de esta solución se realizaron las siguientes diluciones: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 255, 270, 285 y 300 $\mu\text{mol ET/L}$ de ABTS y se aplicó el método antes descrito. La actividad antioxidante se expresó como micromoles equivalentes de TROLOX por litro ($\mu\text{mol ET/L}$). También se utilizó una curva estándar de ácido ascórbico (Anexo) con una solución de 3 mg de ácido ascórbico en 10 mL de agua. A partir de esta solución se hicieron las siguientes diluciones: 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg EAA/L. La actividad antioxidante se expresó como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por litro (mg EAA/L).

7.8.1.3 Ensayo DPPH[•]

La actividad antioxidante en base al radical DPPH[•] se evaluó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001). El reactivo DPPH[•] es un

radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres el electrón no apareado del DPPH[•] se aparea, e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede llegar al amarillo en razón del número de electrones apareados.

La técnica se realizó preparando una solución con 7.5 mg de DPPH[•] en 100 mL de etanol, posteriormente en un vial se colocaron 100 µL de cada extracto y 500 µL de la solución de DPPH[•], se agitaron en vortex y se dejaron reposar durante una hora. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 520 nm usando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KCjunior, USA). Se utilizó una curva estándar de TROLOX (Anexo) con las siguientes concentraciones de TROLOX: 0, 50, 100, 200 y 300 µmol ET/L aplicando la técnica anteriormente descrita. La actividad antioxidante se expresó en micromoles equivalentes de TROLOX por litro (µmol ET/L).

7.8.1.4 Ensayo FRAP

El poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) mide la habilidad de un compuesto antioxidante para reducir el ion férrico (ferric²⁺, 4,6-tripiryridyl-s-triazine [Fe (III)-(TPTZ)₂]³⁺) a complejo ferroso ([Fe (II)-(TPTZ)₂]²⁺) a un pH de 3.6, desarrollando un color azul intenso. Se realizó mediante la metodología descrita por Thaipong *et al.*, (2006).

El procedimiento se inició preparando el reactivo de FRAP en una concentración 10:1:1 con 100 mL de solución amortiguador (0.3 M a pH 3.6), 10 mL de TPTZ (10 mM en HCL) y 10 mL de FeCl₃ (20 mM en agua). Para realizar la técnica se colocaron en viales 30 µL del extracto, 90 µL de agua destilada y 900 µL de FRAP, las muestras se pasaron por vortex y se dejaron en baño maría a 37 °C durante 10 min., transcurrido este tiempo se leyeron las absorbancias en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KCjunior, USA) a 593 nm. Se utilizó una curva estándar de sulfato ferroso (Anexo) con las siguientes concentraciones de Fe (II): 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µmol Fe

(II)/L aplicando la técnica descrita. La actividad antioxidantes se expresó en micromoles de hierro (II) por litro ($\mu\text{mol Fe (II)/L}$).

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron por triplicado, excepto el análisis químico proximal, calidad microbiológica que fueron por duplicado y estabilidad física por cuadruplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE), y se analizaron mediante el modelo unidireccional de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias se compararon a lo largo del almacenamiento entre cada muestra y entre las muestras a través de sus días, utilizando una prueba Duncan con un nivel de significancia de $p < 0,05$, usando el software IBM SPSS Advanced Statistics para Windows, Versión 15.0 (SPSS Inc, EE.UU.).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis químico proximal (AQP)

Los componentes principales de la leche son agua, proteínas, grasa, lactosa y minerales, estos componentes pueden ser influenciados por muchos factores, incluyendo genética y nutrición (Stokes *et al.*, 2000). La Tabla 8 muestra los valores obtenidos de AQP durante los días de almacenamiento de las diferentes muestras tratadas.

Tabla 8 - Valores medios (\pm DE) de análisis químico proximal de leche tratada

Día	Muestras						
	CL	U-10	U-15	HU-10	HU-15	HP	
0	Humedad (%)	87.88 \pm 0.17 ^a	87.94 \pm 0.30 ^a	87.96 \pm 0.35 ^a	88.00 \pm 0.01 ^a	88.22 \pm 0.00 ^a	87.94 \pm 0.08 ^a
	Proteína (%)	3.34 \pm 0.08 ^a	3.33 \pm 0.16 ^a	3.31 \pm 0.16 ^a	3.30 \pm 0.01 ^a	3.32 \pm 0.00 ^b	3.32 \pm 0.04 ^a
	Grasa (%)	3.00 \pm 0.00 ^a	3.00 \pm 0.00 ^a	3.00 \pm 0.00 ^a	3.00 \pm 0.00 ^a	3.00 \pm 0.00 ^a	3.00 \pm 0.00 ^a
	Lactosa (%)	5.06 \pm 0.12 ^a	5.02 \pm 0.18 ^a	5.02 \pm 0.23 ^a	5.00 \pm 0.01 ^a	4.88 \pm 0.00 ^b	5.03 \pm 0.06 ^a
	Ceniza (%)	0.73 \pm 0.02 ^a	0.72 \pm 0.04 ^a	0.72 \pm 0.04 ^a	0.71 \pm 0.00 ^a	0.69 \pm 0.00 ^b	0.72 \pm 0.01 ^a
14	Humedad (%)	90.03 \pm 0.06 ^a	89.00 \pm 0.19 ^d	89.22 \pm 0.09 ^{cd}	89.69 \pm 0.32 ^{ab}	89.50 \pm 0.23 ^{bc}	89.90 \pm 0.53 ^{ab}
	Proteína (%)	3.52 \pm 0.04 ^d	3.91 \pm 0.07 ^a	3.73 \pm 0.04 ^b	3.61 \pm 0.10 ^c	3.49 \pm 0.01 ^d	3.47 \pm 0.28 ^d
	Grasa (%)	0.37 \pm 0.00 ^d	0.34 \pm 0.06 ^d	0.62 \pm 0.01 ^b	0.47 \pm 0.13 ^c	0.80 \pm 0.00 ^a	0.62 \pm 0.10 ^b
	Lactosa (%)	5.32 \pm 0.04 ^{cd}	5.88 \pm 0.09 ^a	5.61 \pm 0.06 ^b	5.44 \pm 0.14 ^c	5.46 \pm 0.28 ^c	5.25 \pm 0.40 ^d
	Ceniza (%)	0.77 \pm 0.01 ^d	0.87 \pm 0.01 ^a	0.83 \pm 0.01 ^b	0.80 \pm 0.02 ^c	0.76 \pm 0.00 ^d	0.77 \pm 0.06 ^d

^{a-d} Distintos superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada

Al analizar las muestras entre días de almacenamiento, en el primer día, la muestra HU-15 (Leche Homogenizada – Termoultrasonificada – 15 min.), comparada con la muestra

control y la pasteurizada mostró el mayor porcentaje de humedad y valores menores en proteína, lactosa y cenizas ($p < 0.05$). Para el día 14 la leche control y la pasteurizada, tuvieron mayor porcentaje de humedad significativamente y la muestra U-10 (Leche Termoultrasonificada – 10 min.) en proteína, lactosa y cenizas, mientras que el contenido de grasa fue mayor en la leche HU-15 ($p < 0.05$) en comparación con el resto de las muestras.

El porcentaje normal de humedad de la leche es de 87.4% (Gutiérrez, 2011) por lo que se puede observar que todas las leches se encontraron por arriba de este valor, sobre todo las leches termoultrasonificadas, esto pudo deberse a que durante el tiempo de aplicación de ultrasonido ocurre una reordenación de macromoléculas, causando desnaturalización proteica, lo cual provoca liberación de agua, esto aunado a que la producción de algunas reacciones químicas y mayores intensidades de cavitación, pueden generar mayor contenido de agua añadida aparente en el medio (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009).

La NOM-155-SCFI-2012, describe un 3% mínimo en contenido de proteína y grasa mientras quede lactosa 4.3%, por lo que se puede observar que las muestras analizadas tuvieron valores dentro de lo establecido. En un estudio realizado por Bermúdez-Aguirre *et al.* (2009) en leche termosonicada (90% amplitud) previamente pasteurizada, presentó resultados inferiores en el contenido de proteínas (3.03%) que los obtenidos en el presente estudio, ellos lo atribuyen a la desnaturalización de las proteínas debido a la pasteurización más el ultrasonido. Lo anterior coincide con lo reportado por Serra *et al.* (2008), donde usaron leche cruda entera aplicando ultra alta presión de homogenización (300 MPa), en donde alcanzaron cerca de 90 °C e indican que esta temperatura provoca una mayor desnaturalización proteica.

Los datos obtenidos del contenido de minerales son similares con los reportados por Mahmood y Usman (2010) en un estudio de diferentes tipos de leche incluida la bovina, donde presentan datos entre 0.40 y 0.80% de cenizas.

8.2 Propiedades fisicoquímicas

La leche forma un sistema fisicoquímico estable de más de 450 compuestos; esto se debe a que todos sus ingredientes se encuentran en equilibrio, estableciendo diversos estados de dispersión. Estas propiedades varían de acuerdo con muchos factores, tales como raza, edad de la vaca, tipo y frecuencia de la alimentación, estado de lactación, temperatura ambiente, enfermedades, época del año, hora del día de la ordeña, etc., (CANILEC, 2011). En la Tabla 9 se presentan los valores obtenidos de propiedades fisicoquímicas de la leche durante el almacenamiento.

El pH representa la acidez actual o desarrollada de la leche y mide la cantidad de H⁺ libres en el medio. Valores normales de pH en leche de vaca oscilan entre 6.4-6.7 debido a la presencia de caseínas, aniones fosfato citrato (Taverna, 2007). Se puede observar que durante sus días de almacenamiento la mayoría de las muestras, tuvieron una disminución ($p < 0.05$) de pH. En cuanto a la comparación entre tratamientos, en el día 0 se observó una ligera disminución de pH en las muestras ultrasonicadas, siendo la muestra U-10 la que mostró menor pH significativamente en comparación con el resto, mientras que la muestra HP tuvo mayor y menor valor ($p < 0.05$) en el día 7 y 14 respectivamente, por lo tanto, todas las muestras se encontraron dentro del rango normal de pH.

La acidez titulable de la leche está determinada por la acidez natural que incluye caseínas, citratos y fosfatos, también está determinada por el ácido láctico y a otros ácidos procedentes de la degradación microbiana de la lactosa y de los lípidos en leches en vías de alteración (Taverna, 2007).

Se puede observar que durante el almacenamiento todas las muestras presentaron altos valores de acidez ($p < 0.05$) en el último día. Comparando los tratamientos por día de almacenamiento, en el día 0 no se observaron diferencias significativas, pero en el

día 7, la leche control tuvo mayores valores de acidez y en el día 14 la muestra U-15 fue menor significativamente en comparación con las demás muestras. El porcentaje normal de ácido láctico en leche de acuerdo a la NOM-155-SCFI-2012, oscila entre 0.13 y 0.17%, por lo que todas las muestras presentaron valores por arriba de lo recomendado.

Tabla 9 - Valores promedio (\pm DE) de las propiedades fisicoquímicas de las muestras

Muestras	Día	pH	AT %	Densidad g/mL	ST %	SNG %
CL	0	6.73 \pm 0.03 ^{ax}	0.21 \pm 0.05 ^{cx}	1.032 \pm 0.00 ^{cx}	11.69 \pm 0.34 ^{ax}	8.69 \pm 0.34 ^{cx}
	7	5.90 \pm 0.00 ^{bz}	0.39 \pm 0.04 ^{bx}	1.035 \pm 0.00 ^{by}	12.51 \pm 0.32 ^{ay}	9.51 \pm 0.33 ^{bx}
	14	5.18 \pm 0.02 ^{cy}	0.68 \pm 0.07 ^{ax}	1.037 \pm 0.00 ^{ax}	12.96 \pm 0.43 ^{ax}	9.97 \pm 0.64 ^{ax}
U-10	0	6.67 \pm 0.06 ^{ay}	0.20 \pm 0.04 ^{bx}	1.032 \pm 0.00 ^{cx}	11.63 \pm 0.43 ^{bx}	8.64 \pm 0.43 ^{cx}
	7	6.29 \pm 0.09 ^{by}	0.23 \pm 0.03 ^{bz}	1.037 \pm 0.00 ^{bx}	12.79 \pm 0.09 ^{ax}	9.80 \pm 0.10 ^{bx}
	14	5.22 \pm 0.03 ^{cy}	0.66 \pm 0.07 ^{ax}	1.038 \pm 0.00 ^{ax}	13.20 \pm 0.15 ^{abx}	10.20 \pm 0.15 ^{ax}
U-15	0	6.71 \pm 0.06 ^{axy}	0.19 \pm 0.04 ^{cx}	1.032 \pm 0.00 ^{bx}	11.64 \pm 0.47 ^{bx}	8.64 \pm 0.47 ^{bx}
	7	6.30 \pm 0.09 ^{by}	0.28 \pm 0.02 ^{by}	1.036 \pm 0.00 ^{axy}	12.73 \pm 0.11 ^{ax}	9.73 \pm 0.11 ^{ax}
	14	6.27 \pm 0.03 ^{bv}	0.31 \pm 0.02 ^{ay}	1.037 \pm 0.00 ^{ax}	13.03 \pm 0.50 ^{abx}	10.04 \pm 0.50 ^{ax}
HU-10	0	6.70 \pm 0.03 ^{axy}	0.20 \pm 0.05 ^{cx}	1.032 \pm 0.00 ^{cx}	11.67 \pm 0.54 ^{bx}	8.67 \pm 0.54 ^{cx}
	7	6.42 \pm 0.03 ^{bx}	0.24 \pm 0.02 ^{bz}	1.036 \pm 0.00 ^{bxy}	12.75 \pm 0.10 ^{ax}	9.75 \pm 0.10 ^{bx}
	14	5.54 \pm 0.04 ^{cx}	0.66 \pm 0.03 ^{ax}	1.038 \pm 0.00 ^{ax}	13.23 \pm 0.25 ^{abx}	10.23 \pm 0.25 ^{ax}
HU-15	0	6.70 \pm 0.06 ^{axy}	0.20 \pm 0.05 ^{cx}	1.032 \pm 0.00 ^{cx}	11.62 \pm 0.40 ^{bx}	8.63 \pm 0.41 ^{cx}
	7	6.41 \pm 0.06 ^{bx}	0.25 \pm 0.00 ^{bz}	1.036 \pm 0.00 ^{bxy}	12.66 \pm 0.16 ^{axy}	9.67 \pm 0.16 ^{bxy}
	14	5.69 \pm 0.09 ^{cw}	0.63 \pm 0.05 ^{ax}	1.038 \pm 0.00 ^{ax}	13.13 \pm 0.33 ^{abx}	10.14 \pm 0.33 ^{ax}
HP	0	6.74 \pm 0.06 ^{ax}	0.20 \pm 0.05 ^{bx}	1.032 \pm 0.00 ^{cx}	11.59 \pm 0.40 ^{bx}	8.60 \pm 0.40 ^{cx}
	7	6.71 \pm 0.01 ^{aw}	0.23 \pm 0.02 ^{bz}	1.036 \pm 0.00 ^{bxy}	12.66 \pm 0.23 ^{axy}	9.66 \pm 0.23 ^{bxy}
	14	5.05 \pm 0.05 ^{bz}	0.63 \pm 0.07 ^{ax}	1.037 \pm 0.00 ^{ax}	13.05 \pm 0.28 ^{abx}	10.05 \pm 0.29 ^{ax}

AT: acidez titulable, ST: sólidos totales, SNG: sólidos no grasos. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Distintos superíndices indican diferencia significativas ($p < 0.05$) en un mismo tratamiento entre los días de almacenamiento; ^{u-z} Distintos superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo día.

Estudios reportan la relación entre la disminución de pH y el aumento de acidez debido a crecimiento de microorganismos (Taverna, 2007), los cuales son responsables de la producción de ácido láctico y por ende la alteración de dichos parámetros (Walstra *et al.*, 2006). Esto coincide con la Figura 9 donde a lo largo del almacenamiento se observó un aumento en el conteo microbiano.

Los resultados de acidez en la muestra control pueden deberse a factores como la lipólisis, por acción enzimática sobre los triglicéridos (Walstra *et al.*, 2006). Mientras que los resultados en las muestras tratadas por termoultrasonido, pudiesen ser atribuidos a que después de la aplicación del tratamiento se aumenta la liberación de ácidos grasos al medio, así como la formación de compuestos como nitritos, peróxido de hidrógeno y nitrato (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009).

Un estudio reportado por Bermúdez-Aguirre *et al.* (2009) en leche sonicada mostró que las leches que fueron sometidas a este tratamiento tuvieron pH más bajo comparadas con la leche control y la pasteurizada, este fenómeno lo atribuyen a la cavitación generada durante el tratamiento, la cual produjo hidrolisis de ésteres (Walstra *et al.*, 2006). Por otro lado, un estudio en leche UHT almacenada a diferentes temperaturas por 180 días, también reportó una disminución de pH que dependió de los días de almacenamiento, lo cual tuvo un efecto significativo y directamente proporcional en el aumento de la acidez (Aldubhany *et al.*, 2014).

En los valores obtenidos de densidad durante el almacenamiento se puede observar (Tabla 9) que hubo un aumento significativo para el día 14, excepto por la muestra U-15. En la comparación de los tratamientos durante el almacenamiento no hubo diferencia en el primer y último día, siendo en el día 7 donde la muestra U-10 presentó la más alta densidad ($p < 0.05$) que las otras leches. De acuerdo al NMX-F-700-COFOCALEC-2012, la densidad de la leche de vaca debe encontrarse entre 1.0295 g/mL y 1.035 g/mL, por lo que se puede apreciar que todas las muestras se encontraron dentro del nivel aceptado.

El porcentaje de sólidos totales de cada tratamiento durante el almacenamiento, presentó un aumento significativo en los días 7 y 14, excepto en la muestra control. Comparando cada tratamiento por día de almacenamiento no se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre las leches en el día 0 y 14, fue en el día 7 donde la muestra control presentó un porcentaje de sólidos totales significativamente más bajo. El porcentaje promedio de ST debe ser mayor de 12.5% y están representados por la grasa en emulsión, las proteínas en suspensión coloidal, lactosa, vitaminas, sales y otros componentes en solución (FAO/WHO, 2007) por lo que se puede observar que todas las muestras en este estudio tuvieron valores dentro del parámetro permitido.

Los sólidos no grasos incluyen todos los componentes de la leche a excepción de la grasa (Meyer, 2014). Los resultados de SNG durante el almacenamiento expresan que todas las muestras presentaron un aumento significativo en el día 14 con, excepto la leche U-15, la cual mantuvo los valores más altos en el día 7 y 14. En cuanto a cada tratamiento por día de almacenamiento, no se presentaron diferencias significativas entre las muestras. El porcentaje de SNG en leche de vaca debe de encontrarse en un rango de 6.45-11.70% (Villafuerte, 2016), como se puede observar, todas las muestras analizadas estuvieron dentro de los límites permitidos.

El aumento de densidad en el último día de almacenamiento, puede deberse a que con el tiempo se aumentan los SNG, por lo que, a mayor concentración de estos, mayor será la densidad (Villafuerte, 2016). En cuanto a los ST el factor que tiene más influencia es la grasa (García y Panadero, 2012), ya que durante la homogenización causada por las ondas ultrasónicas, ocurre una reagrupación de los componentes que altera los glóbulos de grasa creando microestructuras, que provocan una disminución aparente de la grasa en las leches sonicadas (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009). Por otro lado, los valores obtenidos son comparables con lo reportado por Hassan *et al.*, 2009 en leche UHT almacenada durante doce semanas, donde los SNG se encontraron en un rango de 8.55-8.85%. El aumento de SNG durante el almacenamiento se debe a la relación que existe entre estos y la variación del contenido de proteína de la leche

(Villafuerte, 2016). Esto concuerda con los resultados de la composición química proximal (Tabla 9) donde la proteína aumentó en el día 14.

8.2.1 Estabilidad

El índice de estabilidad se evaluó mediante la determinación del porcentaje de partículas sedimentadas (% p/p) después de llevar a cabo una centrifugación. Los resultados de dicha prueba se muestran en la Figura 7.

Donde se puede observar que a lo largo de su almacenamiento, los datos mayores ($p < 0.05$) se encontraron en su mayoría en el día 14, y los menores, en el primer día. Comparando los diferentes tratamientos entre días de almacenamiento, la muestra U-15 (Leche Termoultrasonificada – 15 min.) presentó un menor porcentaje ($p < 0.05$) de partículas sedimentadas a lo largo de los días, mientras que la leche control obtuvo porcentajes que se duplicaron para el día 14 (4.15 ± 0.29 a $9.54 \pm 0.28\%$) un comportamiento similar se observa en la muestra pasteurizada, donde el parámetro evaluado triplicó su porcentaje para el mismo día (3.63 ± 0.41 a $10.49 \pm 0.29\%$). Datos altos de este parámetro indican una baja estabilidad como consecuencia de la sedimentación de las partículas (Cruz *et al.*, 2007), por lo tanto la leche U-15 tuvo una mejor estabilidad a lo largo del almacenamiento en comparación con el resto de las muestras, esto puede atribuirse a la aplicación misma del ultrasonido ya que estudios reportan que dicha tecnología pudo haber reducido la sedimentación al fragmentar las moléculas en partículas más pequeñas, debido al alto efecto de cizallamiento producido durante la cavitación (Seshadri *et al.*, 2003).

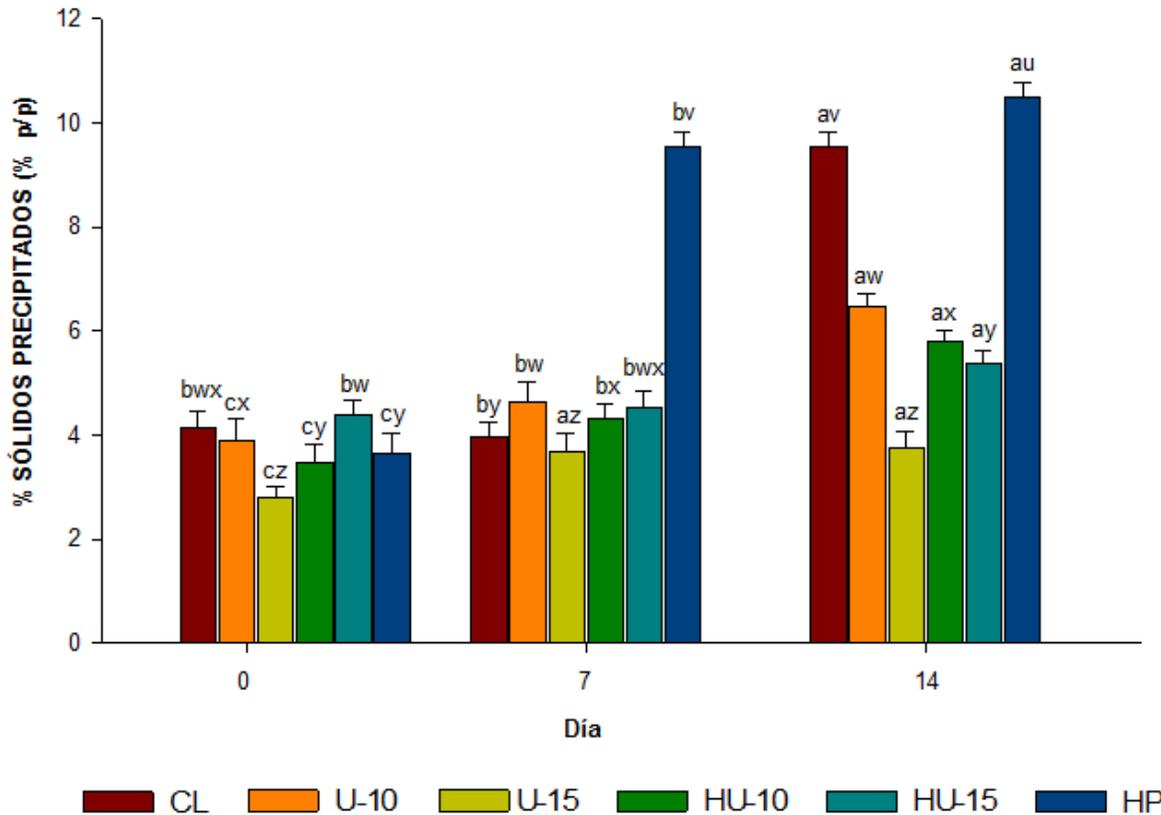


Figura 7 - Índice de estabilidad de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 minutos. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de un mismo tratamiento entre los días de almacenamiento; ^{u-z} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo día. % p/p: Porcentaje de sólidos precipitados.

8.2.2 Fosfatasa alcalina

En este estudio se realizó la prueba rápida de fosfatasa alcalina en el día 0 y 7, esta prueba indica la inactivación de esta enzima así como de microorganismos patógenos. En la Figura 9, se puede observar que la muestra control y las tratadas con termoultrasonido, dieron positivo a la prueba en ambos días. Por el contrario, la leche pasteurizada y la muestra tratada a 85 °C (control negativo), dieron resultado negativo a la prueba, esto indica que la pasteurización se realizó de manera adecuada, ya que esta enzima se utiliza como indicador de una pasteurización efectiva en la leche (INEN, 1973).

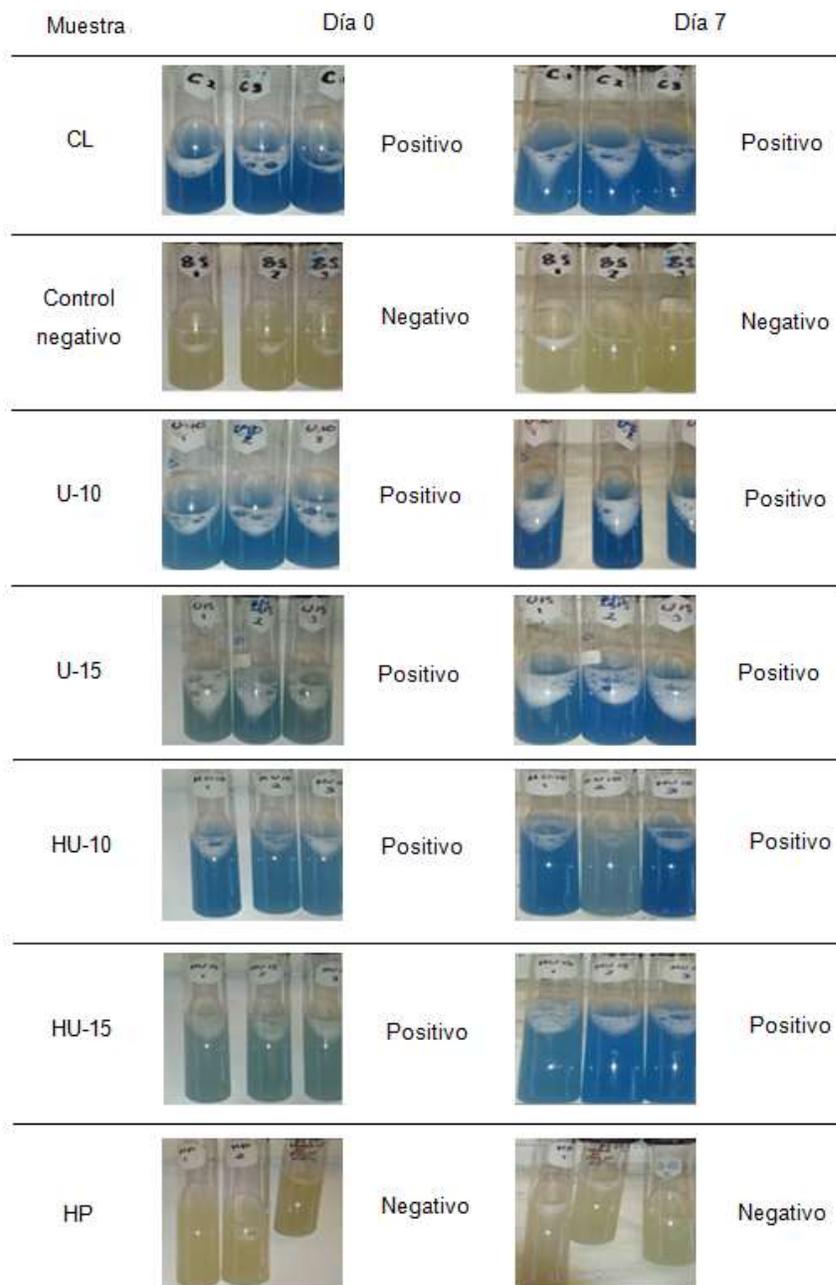


Figura 8 – Prueba de fosfatasa alcalina en los días 0 y 7 de almacenamiento. Control negativo: Leche con tratamiento previo a 85 °C/2 s. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada.

Los resultados positivos en las muestras ultrasonificadas, pudieron deberse a las condiciones de temperatura y amplitud usadas, ya que se ha reportado que la fosfatasa puede inactivarse con una temperatura de 56 °C durante 30 min (Rankin *et al.*, 2010), y

la temperatura máxima de salida que se alcanzó en las muestras fue ligeramente menor, con 55.5 °C durante 15 min (Tabla 7), sin embargo cabe resaltar que estas condiciones de tratamiento, presentaron una reducción de la carga microbiana similar a la pasteurización (Figura 9) pero mayor en AFM₁ (Figura 10).

No existen reportes de inactivación de esta enzima por ultrasonido, sin embargo estudios en alta presión en condiciones de 400 a 800 MPa, a temperaturas en un rango de 5 a 40 °C, lograron inactivarla (Rademacher y Hinrichs, 2006); así como también por alta presión de homogenización esto debido a las fuerzas mecánicas, el corte, la cavitación y el impacto (Picart *et. al.*, 2006).

8.2.3 Color

El color es un atributo de calidad importante en la industria de los alimentos, e influye en la aceptación por parte de los consumidores (Pingret *et al.*, 2013). Este se rige por cambios químicos, bioquímicos, microbianos y físicos, que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Pathare *et al.*, 2013). En la Tabla 10 se observa que la luminosidad (L^*) de las muestras aumentó significativamente durante el periodo de almacenamiento. Comparando los tratamientos por día de almacenamiento, en el día 0 y 7 las muestras pasteurizada y HU-10 tuvieron mayor luminosidad respectivamente, mientras que esta última y la U-10 fueron mayores ($p < 0.05$) para el día 14.

En la coordenada a^* (eje del verde⁽⁻⁾ al rojo⁽⁺⁾), se detectó una contribución negativa y un aumento significativo a lo largo de los días, a excepción de la leche pasteurizada. En los tratamientos entre sus días de almacenamiento, se puede observar que en el primer y último la muestra HP día fue menor, y en el día 7 mayor ($p < 0.05$) respecto al resto.

En los resultados de la coordenada b^* (eje azul⁽⁻⁾ al amarillo⁽⁺⁾) durante el almacenamiento, todas las leches tuvieron un aumento en el último día, excepto la

muestra HP. Comparando los tratamientos por día de almacenamiento, en el día 0 y 7 la muestra HU-10 fue mayor ($p < 0.05$) y en el último día fue la muestra control.

El nivel de saturación se expresa con los valores de cromaticidad (C) donde a lo largo del almacenamiento, los valores más altos se encontraron en el día 0. En cuanto a los tratamientos por día de almacenamiento, en el primer y último día la leche U-10 y control fueron mayores ($p < 0.05$) respectivamente, mientras que en el día 7 no se presentaron diferencias significativas, a excepción de la leche HP que tuvo una menor saturación.

Se puede observar que durante el almacenamiento todos los tratamientos presentaron valores negativos de tonalidad (hue, °h). En cuanto a las muestras por día de almacenamiento, en el primer y último día la leche HP tuvo mayor y menor tonalidad ($p < 0.05$) respectivamente, mientras que en el día 7 la U-10 fue mayor.

Durante el almacenamiento, la diferencia de color (ΔE) con la leche pasteurizada fue menor en el día 7, mientras que con la muestra control fue en el día 0. Comparando los tratamientos por día de almacenamiento, la muestra U-10 y HU-15 presentaron un color más parecido ($p < 0.05$) con la muestra HP, mientras que la HU-10 lo tuvo con la leche control. Según la norma ISO 12647-2 que clasifica el umbral de tolerancia para ΔE , establece que valores < 3 indican diferencia de color apenas perceptible, mientras que valores de $\Delta E > 5$ indican diferencia de color evidente, por lo tanto se puede observar que en el día 0 todas las muestras termoultrasonificadas comparado con la muestra control, tuvieron una diferencia de color apenas perceptible (< 1.74), mientras que con la muestra pasteurizada la diferencia fue > 3 , sin embargo estos valores se encuentran dentro del parámetro normal según esta escala.

En relación a la disminución de la luminosidad durante el almacenamiento en la leche pasteurizada, esta puede deberse a la reacción de Maillard producida durante el procesamiento de la muestra, ya que al reaccionar el grupo aldehído de la lactosa con el grupo ϵ -amino de los residuos lisilo de las proteínas se generan productos

pigmentados marrones como pirazinas y melanoidinas, dichos productos pueden seguir desarrollándose durante el almacenamiento (Gaucher *et al.*, 2008). Además la luminosidad pudiese ser afectada por la separación del suero y al crecimiento de bacterias durante el almacenamiento (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009). Mientras que en las leche termoultrasonificadas el aumento de luminosidad, pudo deberse a la reducción del tamaño del glóbulo de grasa causada por la homogenización producida por el fenómeno de cavitación (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009), esto permite una mejor refracción de la luz a través de la muestra (Pereda *et al.*, 2007). Caso contrario ocurrió en la leche control, la cual al no ser sometida a homogenización, presentó color más amarillo, reflejado en los parámetros de b^* .

Tabla 10 - Valores promedio (\pm DE) de los parámetros y diferencia de color durante el almacenamiento

Día	Muestras						
	CL	U-10	U-15	HU-10	HU-15	HP	
L^*	0	63.02 \pm 0.50 ^{bz}	62.53 \pm 1.02 ^{cz}	64.04 \pm 0.79 ^{cy}	62.61 \pm 1.29 ^{cz}	63.34 \pm 1.29 ^{cyz}	66.61 \pm 0.66 ^{bx}
	7	62.54 \pm 0.66 ^{bz}	67.80 \pm 0.51 ^{by}	69.73 \pm 0.24 ^{ax}	71.50 \pm 0.16 ^{aw}	69.44 \pm 0.26 ^{ax}	67.97 \pm 0.50 ^{ay}
	14	70.53 \pm 1.25 ^{aw}	71.38 \pm 0.42 ^{av}	68.04 \pm 0.20 ^{bx}	71.38 \pm 0.40 ^{av}	66.98 \pm 0.25 ^{by}	62.76 \pm 0.27 ^{cz}
a^*	0	-3.56 \pm 0.04 ^{bx}	-3.63 \pm 0.27 ^{axy}	-3.65 \pm 0.27 ^{bxy}	-3.58 \pm 0.25 ^{bxy}	-3.75 \pm 0.00 ^{by}	-4.06 \pm 0.06 ^{az}
	7	-4.52 \pm 0.23 ^{by}	-4.85 \pm 0.03 ^{bz}	-4.55 \pm 0.03 ^{cy}	-4.61 \pm 0.02 ^{cyz}	-4.58 \pm 0.06 ^{cy}	-3.86 \pm 0.54 ^{ax}
	14	-2.42 \pm 1.91 ^{ax}	-3.67 \pm 0.08 ^{ay}	-3.23 \pm 0.02 ^{ay}	-3.35 \pm 0.06 ^{ay}	-2.95 \pm 0.03 ^{axy}	-4.50 \pm 0.03 ^{bz}
b^*	0	5.46 \pm 0.20 ^{ay}	6.12 \pm 0.29 ^{ay}	5.41 \pm 0.12 ^{ay}	5.72 \pm 0.15 ^{ax}	4.81 \pm 0.32 ^{az}	4.67 \pm 0.37 ^{az}
	7	1.23 \pm 0.05 ^{cy}	0.23 \pm 0.16 ^{cz}	1.30 \pm 0.07 ^{cy}	1.60 \pm 0.25 ^{cw}	1.43 \pm 0.09 ^{cx}	1.74 \pm 0.05 ^{bv}
	14	4.88 \pm 0.15 ^{bu}	2.84 \pm 0.05 ^{bx}	3.36 \pm 0.05 ^{bw}	2.56 \pm 0.08 ^{by}	3.89 \pm 0.07 ^{bv}	1.81 \pm 0.12 ^{bz}
C	0	6.50 \pm 0.19 ^{ay}	7.13 \pm 0.13 ^{aw}	6.54 \pm 0.14 ^{ay}	6.75 \pm 0.21 ^{ax}	6.10 \pm 0.28 ^{az}	6.19 \pm 0.31 ^{az}
	7	4.69 \pm 0.21 ^{cx}	4.85 \pm 0.04 ^{bx}	4.73 \pm 0.02 ^{bx}	4.89 \pm 0.09 ^{bx}	4.80 \pm 0.04 ^{bx}	4.24 \pm 0.50 ^{cy}
	14	5.74 \pm 0.13 ^{bw}	4.64 \pm 0.06 ^{cy}	4.66 \pm 0.04 ^{by}	4.22 \pm 0.05 ^{cz}	4.89 \pm 0.06 ^{bx}	4.85 \pm 0.05 ^{bx}
$^{\circ}h$	0	-57.07 \pm 0.86 ^{by}	-59.28 \pm 3.07 ^{cz}	-56.04 \pm 2.3 ^{cy}	-57.95 \pm 1.80 ^{cyz}	-51.94 \pm 1.62 ^{bx}	-48.87 \pm 1.91 ^{cw}
	7	-15.35 \pm 1.25 ^{aw}	-2.73 \pm 1.96 ^{av}	-15.96 \pm 0.89 ^{awx}	-19.06 \pm 2.76 ^{ay}	-17.42 \pm 1.28 ^{axy}	-24.63 \pm 3.18 ^{bz}
	14	-58.26 \pm 1.53 ^{by}	-37.81 \pm 0.84 ^{bxy}	-46.05 \pm 0.50 ^{by}	-37.46 \pm 1.26 ^{bxy}	-52.79 \pm 0.59 ^{by}	-21.87 \pm 1.30 ^{ax}
ΔE	0	3.33 \pm 0.13 ^{cy}	3.71 \pm 0.45 ^{bx}	3.22 \pm 0.27 ^{byz}	3.03 \pm 0.33 ^{cz}	3.61 \pm 0.26 ^{bx}	-
	7	4.96 \pm 0.35 ^{bw}	1.71 \pm 0.05 ^{cz}	2.11 \pm 0.11 ^{cy}	3.58 \pm 0.21 ^{bx}	1.73 \pm 0.10 ^{cz}	-
	14	8.81 \pm 0.33 ^{aw}	8.61 \pm 0.14 ^{awy}	5.59 \pm 0.19 ^{ay}	8.57 \pm 0.31 ^{ax}	5.10 \pm 0.14 ^{az}	-
ΔE	0	-	1.74 \pm 0.18 ^{cx}	0.80 \pm 0.13 ^{cy}	0.40 \pm 0.03 ^{cz}	0.40 \pm 0.16 ^{cy}	3.27 \pm 0.08 ^{cw}
	7	-	5.44 \pm 0.21 ^{ay}	7.40 \pm 0.36 ^{aw}	8.73 \pm 0.24 ^{av}	6.77 \pm 0.22 ^{ax}	4.39 \pm 0.17 ^{bz}
	14	-	2.37 \pm 0.19 ^{bz}	3.62 \pm 0.16 ^{bx}	3.22 \pm 0.26 ^{by}	4.27 \pm 0.14 ^{bw}	9.08 \pm 0.20 ^{av}

CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencia significativas ($p < 0.05$) en un mismo tratamiento entre los días de almacenamiento; ^{v-z} Distintos superíndices en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo día.

8.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA

8.3.1 Mesófilos aerobios y enterobacterias

La pasteurización convencional y la esterilización, son métodos mayormente utilizados para reducir microorganismos en los productos alimenticios (Lee *et al.*, 2009). Sin embargo, estos métodos térmicos afectan adversamente la calidad sensorial y el valor nutricional de los alimentos (Knorr, 1993).

A largo del almacenamiento, en el crecimiento de las bacterias mesófilas (Figura 9A) se observó un aumento en el día 7 en la leche control y pasteurizada y para el último día todas las muestras tuvieron el mismo comportamiento a excepción de la control. En el análisis de los diferentes tratamientos los menores valores en los días 1, 7 y 14 se aprecian en las muestras HP, HU-15 y U-15 con 2.50 ± 0.00 , 2.45 ± 0.08 y 4.79 ± 0.02 Log UFC/mL respectivamente, comparadas con el resto. La NOM-243-SSA1-2010 en el conteo de mesófilos aerobios para leche cruda de vaca, indica un valor permisible $\leq 100,000$ UFC/mL (5 Log UFC/mL), por lo tanto todas las muestras a excepción de la CL (5.47 ± 0.14 Log UFC/mL) y la HU-10 (5.17 ± 0.21 Log UFC/mL), se encontraron dentro de lo establecido por dicha norma. En un estudio realizado en leche pasteurizada por Elrahman *et al.*, (2015), en el conteo total de bacterias se encontraron valores inferiores (2.53 ± 0.05 Log UFC/mL) comparados con los obtenidos en este estudio, a excepción de la leche HP que mostró 2.45 ± 0.08 Log UFC/mL.

El conteo de enterobacterias presentes en leche debe ser < 20 UFC/mL (1 Log UFC/mL) de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010, en la Figura 9B se observa que la muestra HU-15 y la pasteurizada fueron las únicas que mostraron valores de acuerdo con lo señalado. A lo largo del almacenamiento todas las muestras aumentaron su conteo para el último día, siendo la leche control la que mostró los valores más altos.

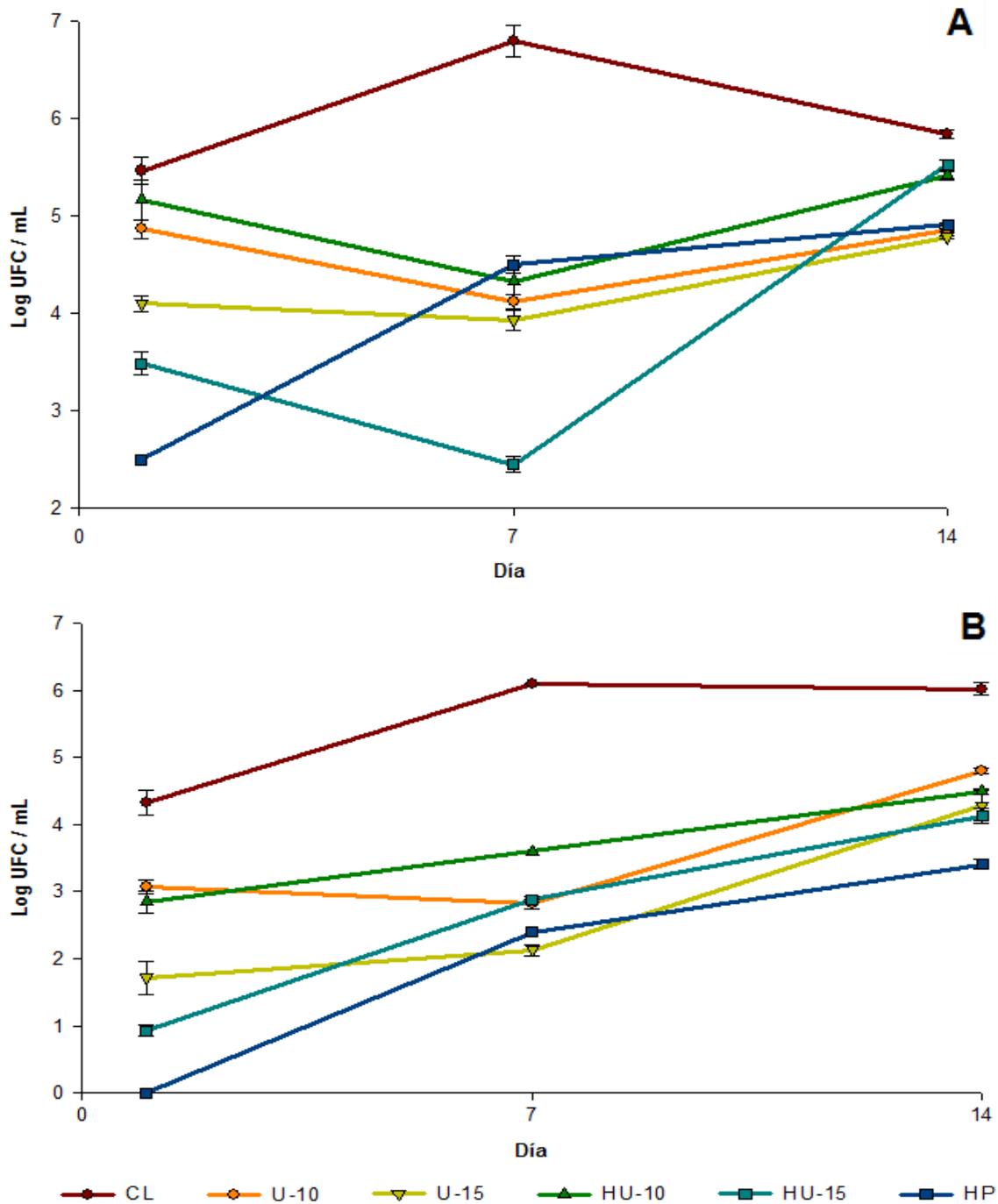


Figura 9 – Contenido de mesófilos aerobios (A) y enterobacterias (B) de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C. Log UFC/mL: Logaritmo de unidades formadoras de colonias/ mililitro. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada – 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada.

En la comparación de los diferentes tratamientos la leche HP tuvo contenido nulo en el primer día y contenido menor en el día 14 con 3.41 ± 0.06 Log UFC/mL, mientras que en el día 7 la leche U-15 (2.13 ± 0.08 Log UFC/mL) presentó menor valor respecto a la muestra CL y el resto de las muestras termoultrasonificadas. Un comportamiento similar al de la muestra HU-15 concuerda con el estudio de Ordoñez *et al.*, (1987) donde combinaron ultrasonido y temperatura (5-62 °C) para lisis bacteriana, ellos encontraron que dicha combinación es significativamente más eficaz en la eliminación de bacterias.

La disminución de la carga microbiana de las muestras termoultrasonificadas, en especial la HU-15, pudo deberse a que los cambios de presión generados por las ondas ultrasónicas de la cavitación, son responsables de la muerte bacteriana (Piyasena *et al.*, 2003). Además puede ser consecuencia del tiempo y la temperatura de salida (15 min a 55.5 °C) durante el procesamiento (Tabla 7), ya que de acuerdo a la USDA (2000) los factores que influyen en la lisis microbiana son, el tiempo de exposición/contacto, temperatura del tratamiento y la amplitud de las ondas ultrasónicas, además con una mayor amplitud, se genera una inactivación total y escasa posibilidad de recuperación celular después del tratamiento.

Las variaciones observadas a lo largo del almacenamiento (disminución, aumento de UFC) en las leches termoultrasonificadas, pueden atribuirse a la permeabilización reversible de las membranas de los microorganismos (Pitt y Ross., 2003). El uso del ultrasonido puede ocasionar la ruptura de las paredes celulares, y por tanto, la liberación de sus contenidos (Mason *et al.*, 1996), haciéndolo disponible para el crecimiento de las bacterias (Cheng *et al.*, 2007 y Yang *et al.*, 2008). De esta manera, la respiración de los microorganismo y la biosíntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas pudieran recuperarse, y permitir la regeneración de la membrana celular, así como la fisiología y la integridad estructural de las bacterias (Fernandez, 2000).

8.3.2 Aflatoxinas

La AFM₁ es un metabolito hidroxilado de la AFB₁ que se puede encontrar en la leche de animales que son alimentados con maíz u otros cereales contaminados con AFB₁ (Chen *et al.*, 2011).

El análisis de concentración de AFM₁ se muestra en la Figura 10, donde se aprecia que en todas las muestras aumentó la concentración para el último día de almacenamiento, a excepción de la leche HU-15 que se redujo de $9,408.88 \pm 134.37$ a $4,506.47 \pm 168.67$ EAFM₁ pg/L. En la comparación entre tratamientos, en el primer día, la leche U-10 con 149.99 ± 4.99 EAFM₁ pg/L mostró el menor contenido significativamente en comparación con el resto, mientras que la U-15 presentó menor concentración de AFM₁ con $1,985.41 \pm 81.96$ y $2,607.88 \pm 54.55$ EAFM₁ pg/L en los días 7 y 14 respectivamente. Caso contrario se observa en la leche control, la cual mantuvo la mayor concentración significativamente en los días 0, 7 y 14 con $12,035.91 \pm 200.43$, $12,682.44 \pm 83.84$ y $12,844.94 \pm 53.14$ EAFM₁ pg/L, respectivamente. La NMX-F-700-COFOCALEC-2012 indica un valor máximo permisible de AFM₁ en leche cruda de 0.5 µg/L (500,000 pg/L) por lo tanto, ninguna de las muestras analizadas supera dicho valor. Sin embargo, la tendencia de la muestra HU-15 es más estable durante el almacenamiento que el de la leche U-15, la cual tiende a aumentar la concentración de AFM₁ después del día 14 de almacenamiento.

La AFM₁ es estable en procesos de pasteurización y esterilización (Iha *et al.*, 2013), donde la contaminación original permanece prácticamente inalterada después del tratamiento (Tabari *et al.*, 2013), se pudo observar que la leche pasteurizada no siguió el mismo comportamiento ya que a lo largo del almacenamiento presentó variabilidad en la concentración de AF.

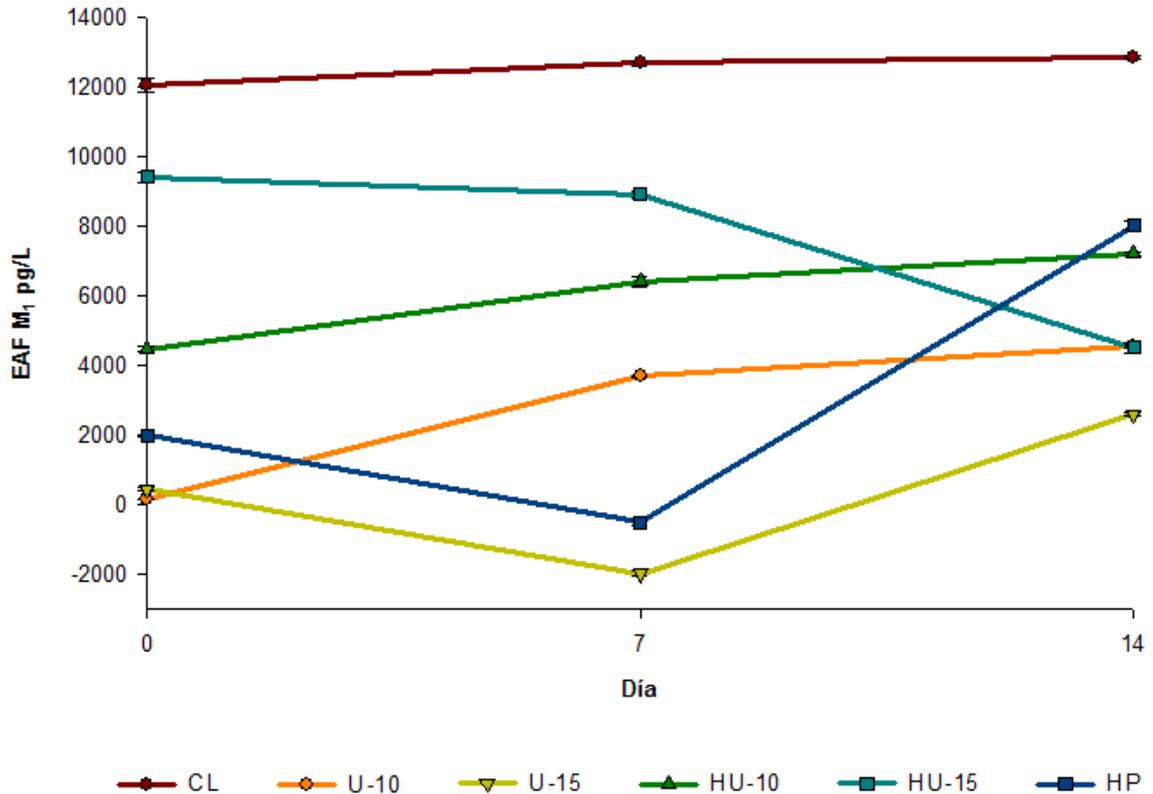


Figura 10 – Análisis del contenido de aflatoxina M₁ de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C. EAFM₁ pg/L: equivalentes de aflatoxinas M₁ picogramo/litro. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada.

Por otro lado la disminución general observada en las leches termoultrasonificadas, se puede atribuir al mecanismo de implosión del ultrasonido, que afecta la estructura de las células y compuestos en el micro entorno (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez., 2012), tal pudo ser el caso de las AF, que a pesar de ser estables al calor, pudieron haber sido dañadas por el efecto de la cavitación y el cizallamiento (Fernández *et al.*, 2012). No existen antecedentes de AFM₁ en leche por ultrasonido, sin embargo, en un estudio realizado por Mohammad *et al.*, (2015) con ultrasonido en AFB₁, reportaron una reducción del 42%, indicando que la disminución de esta AF en alimentos puede ser menor, ya que influyen las características propias de cada alimento. La prueba empleada en el análisis que se realizó solo mide la AFM₁ libre en el medio, pero no la que podría estar ligada a otros compuestos como las proteínas, las cuales posiblemente pudieron haber sido degradadas durante el almacenamiento por los

microorganismos presentes en las muestras, ya que se reflejó un incremento en ambos. Sin embargo, para confirmar si realmente es debido a lo anterior, se requiere un análisis más profundo sobre este efecto.

8.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes en la leche son de gran importancia ya que impiden la peroxidación lipídica y mantienen su calidad, estos compuestos se encuentran principalmente en la caseína y en el suero (Lindmark-Mansson y Akesson., 2000).

8.4.1 Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante y pueden encontrarse en alimentos de origen vegetal y animal (Vinson *et al.*, 2001). En la Figura 11 se puede observar que durante los días de almacenamiento el contenido fenólico total en el día 0 fue significativamente más alto con un parámetro entre 44.26-56.66 mg EAG/L respecto a los demás días. Comparando los tratamientos entre días de almacenamiento, la muestra CL tuvo el contenido más bajo ($p < 0.05$) en el día 7 y 14 con 6.78 y 20.15 mg EAG/L respectivamente, mientras que el tratamiento HU-10 (Leche Homogenizada – Termoultrasonificada – 10 min.) en el día 7 y HU-15 en el día 14 tuvieron mayor contenido significativamente que la leche control y las demás muestras tratadas con 29.93 ± 1.41 y 56.66 ± 1.58 mg EAG/L, respectivamente.

En un estudio realizado por Dande y Manchala (2011) en leche, obtuvieron un contenido de fenoles de 3.4 ± 0.4 mg EAG/100 g, los cuales fueron mayores a los obtenidos en la muestra control (44.26 ± 1.60 mg EAG/L). O'Connel y Fox (2001) atribuyen esta diferencia en gran medida a la región, el estado de lactación, la alimentación de la vaca e incluso al catabolismo de aminoácidos. El alto contenido de fenoles en las leches termoultrasonificadas en el día 0, pudo deberse a la liberación de ácidos fenólicos por acción de la cavitación durante el tratamiento (Chen *et al.*, 2007) y

su incremento en el último día podría atribuirse a que durante el almacenamiento, los microorganismos produjeron una ligera fermentación de los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) a partir de reacciones de desaminación, transaminación, descarboxilación y deshidrogenación, causando la liberación de su grupo fenol (Smith y Macfarlane, 1996).

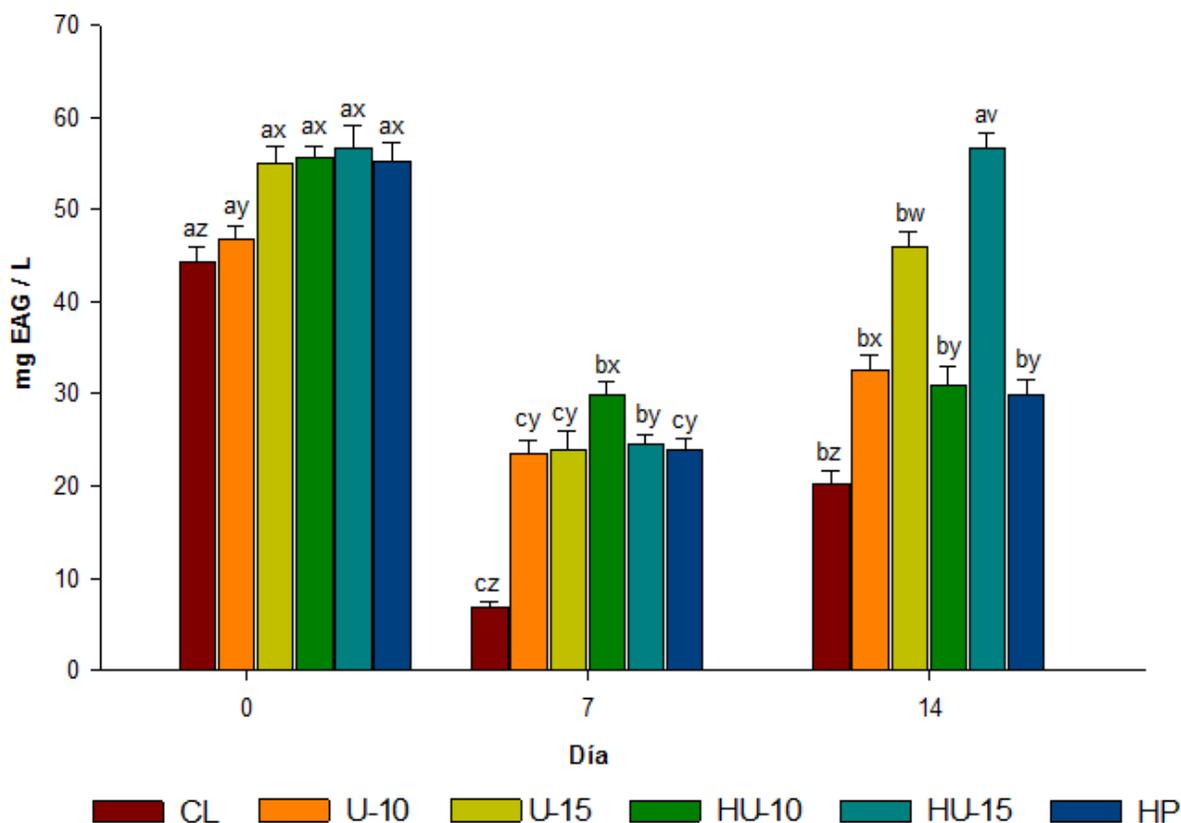


Figura 11 - Contenido de fenoles totales de las diferentes muestras entre los días de almacenamiento. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Distintos superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre días; ^{x-z} Distintos superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos. mg EAG/L: Miligramos equivalentes de ácido gálico por litro.

8.4.2 Actividad antioxidante por ABTS•+

La actividad antioxidante mediante la medición del radical ABTS se utiliza con frecuencia por la industria alimentaria y la investigación agrícola, ya que mide la

capacidad de sustancias puras, para atrapar radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno o electrones (Coria *et al.*, 2011). Una de las formas más convenientes para expresar la capacidad antiradical es la utilizada por ABTS/EAA, ya que el ácido ascórbico o vitamina C es una de las principales sustancias responsables de la actividad antioxidante (Kim *et al.*, 2002).

Los resultados de ABTS/ET se observan en la Figura 12A, donde a lo largo de los días de almacenamiento la mayoría de las muestras fueron significativamente mayores en el primer día comparado con el resto. En cuanto a los tratamientos aplicados por días de almacenamiento, en los días 0 y 7 la leche pasteurizada se encontró con el mayor contenido ($p < 0.05$) que la leche control y las termoultrasonicadas con $78,762.83 \pm 38.21$ y $1,213.75 \pm 70.40$ $\mu\text{mol ET/L}$, respectivamente, para el último día la leche control tuvo mayor actividad antioxidante ($1,508.18 \pm 102.26$ $\mu\text{mol ET/L}$), respecto a las demás muestras. Resultados inferiores ($2,241$ $\mu\text{mol ET/L}$) se encontraron en leche no pasteurizada (Chen *et al.*, 2003) comparados con las leche U-10, HU-10 y HP.

En la Figura 12B se presentan los resultados de ABTS/EAA, donde durante el almacenamiento, hubo un aumento significativo en todas las leches a través de los días. Comparando los tratamientos entre días de almacenamiento, en el primer día solo se detectó actividad antioxidante en la HU-10 con 3.10 ± 0.45 mg EAA/L, mientras que en el día 7 y 14 la leche U-15 mostró los valores más altos significativamente (504.40 ± 36.29 y $1,054.04 \pm 37.28$ mg EAA/L, respectivamente) en comparación con la leche control y las tratadas. La actividad antioxidante observada en las leches termoultrasonicadas, pudo deberse a que el ultrasonido causa irrupción de las paredes celulares biológicas facilitando la liberación de contenidos, entre ellos pudieran encontrarse la vitamina E en forma de α -tocoferol que confiere capacidad antioxidante, esto de acuerdo a Karmowski *et al.*, (2015) que reportan la presencia de dicho compuesto en crema y leche de vaca.

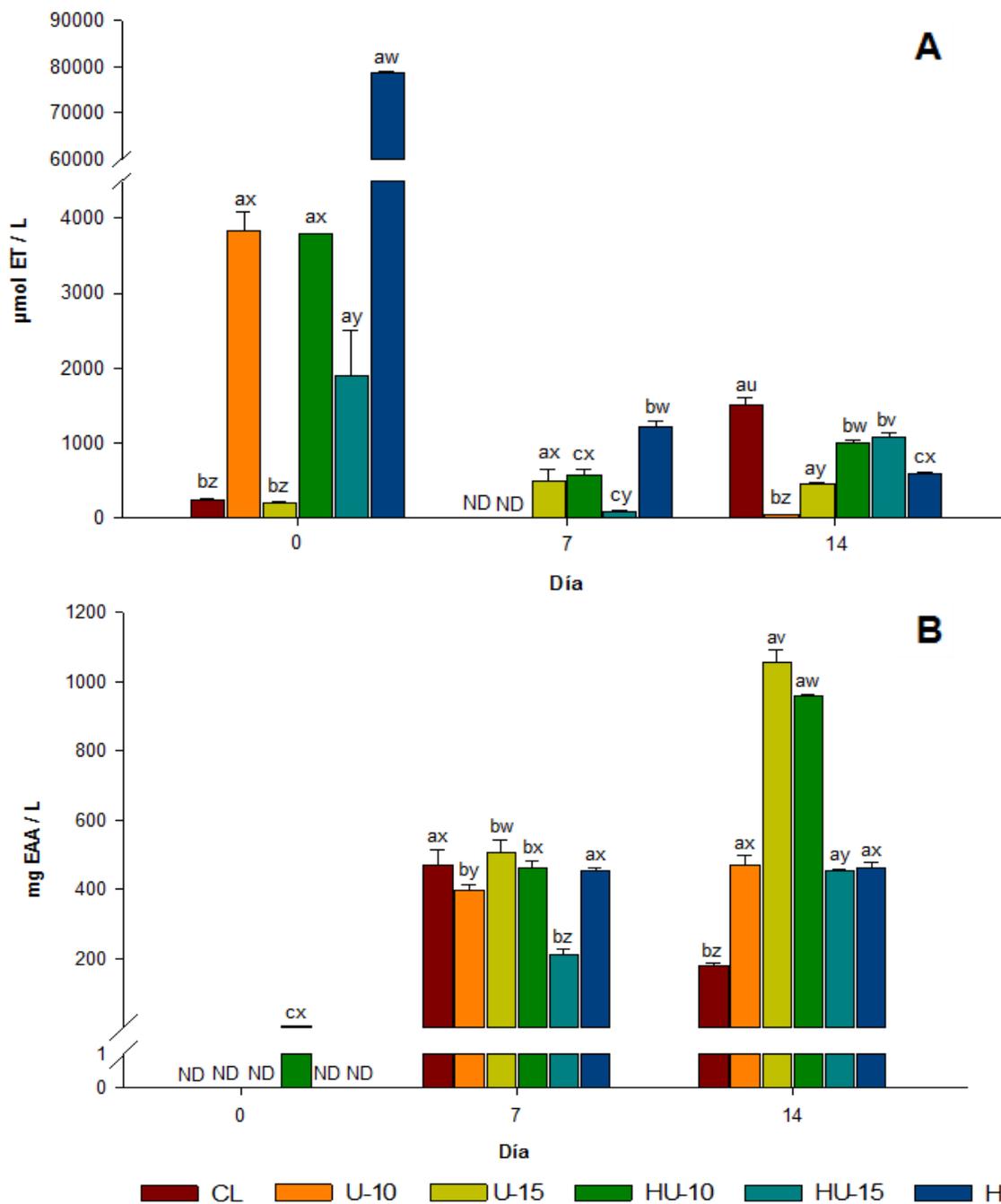


Figura 12 - Actividad antioxidante por ABTS/ET (A) y ABTS/EAA (B) de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencia significativas ($p < 0.05$) en un mismo tratamiento entre los días de almacenamiento; ^{u-z} Distintos superíndices en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo día. $\mu\text{mol ET/L}$: Milimoles equivalentes de TROLOX por litro. mg EAA/L: miligramos equivalentes de ácido ascórbico por litro.

8.4.3 Actividad antioxidante por DPPH•

El método DPPH se utiliza comúnmente para la evaluación del potencial de barrido de radicales libres de una molécula antioxidante y se considera como uno de los métodos colorimétricos estándar y fáciles para la evaluación de propiedades antioxidantes de compuestos puros. Aunque este radical tiene similitudes limitadas con los radicales piróxilo, actúa bien en diferentes sistemas disolventes incluyendo etanol, acetona y alcohol acuoso, metanol y benceno (Cheng *et al.*, 2006).

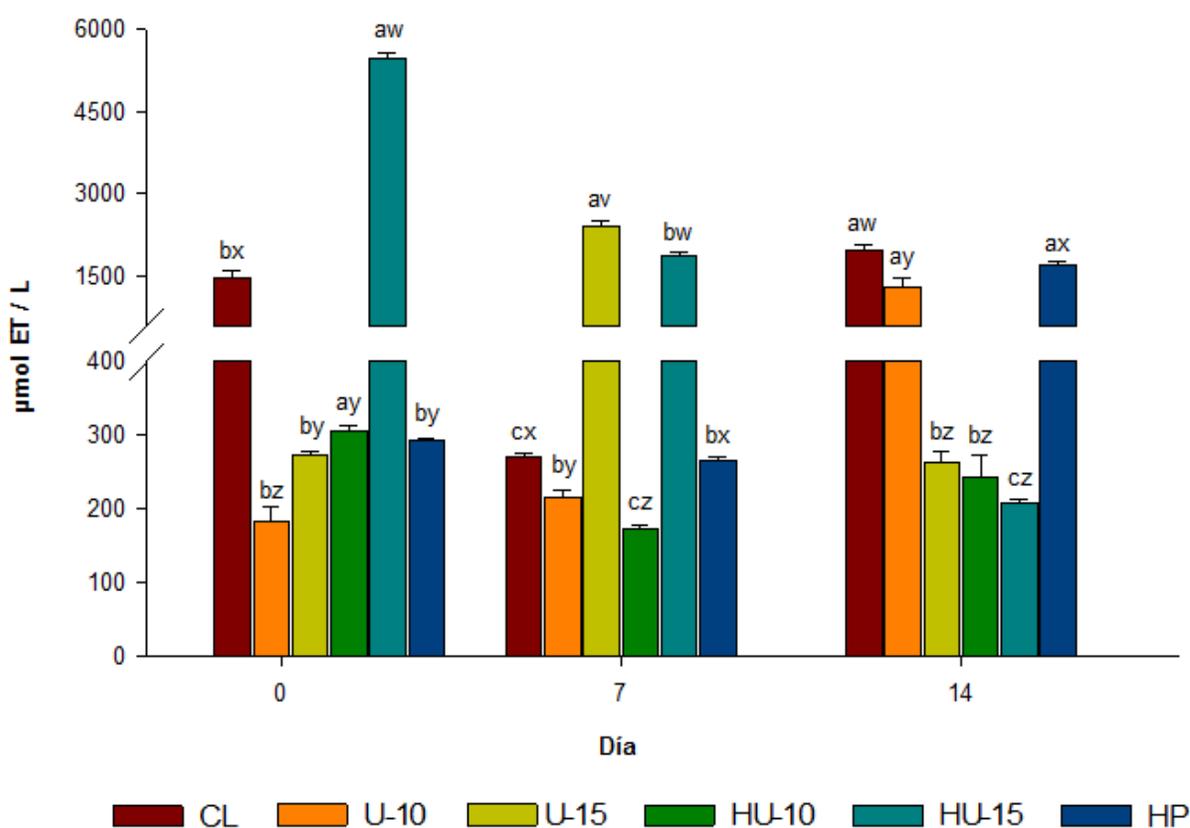


Figura 13 - Actividad antioxidante por DPPH de las diferentes muestras analizadas durante el almacenamiento a 4 °C. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencia significativas ($p < 0.05$) en un mismo tratamiento a lo largo del almacenamiento; ^{v-z} Distintos superíndices en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo día. µmol ET/L: Milimol equivalente de TROLOX por litro

En la Figura 13 se observa la actividad antioxidante por DPPH donde se presentaron diferencias significativas en las diferentes leches lo largo del almacenamiento, mientras que en la comparación de los tratamientos a través de los días, la muestra HU-15 en el día 0 presentó mayor actividad antioxidante ($p < 0.05$) que la leche control y las tratadas con $27,400.77 \pm 441.17 \mu\text{mol ET/L}$, en el día 7 la muestra U-15 fue más alta significativamente que la leche control y las demás muestras tratadas con $12,116.17 \pm 458.98 \mu\text{mol ET/L}$, mientras que en el último día de almacenamiento las leches control, U-10 y HU-15 presentaron la mayor actividad antioxidante ($p < 0.05$) que el resto de las muestras.

Es posible argumentar que la presencia de compuestos liposolubles de la leche como vitamina E y A, son las que le confieren la actividad antioxidante. En un estudio realizado por Bucevic-Popovic *et al.*, (2014) menciona que existe una alta relación entre la actividad antioxidante y la matriz lipídica (aproximadamente 70% de ácidos grasos saturados, 26% de ácidos grasos monoinsaturados, y 4% de ácidos grasos poliinsaturados), de esta manera podría decirse que dicha actividad proviene directamente de la matriz lipídica (Jensen, 2002). Aunque se requiere evaluar el perfil lipídico de las muestras de este estudio.

8.4.4 Actividad antioxidante por FRAP

En los resultados de actividad antioxidante por FRAP (Figura 14) se aprecia que en la leche control, HU-15 y HP no fue detectada actividad antioxidante por este método. Durante los días de almacenamiento, en el día 0 se encontró la capacidad antioxidante más baja. Comparando los tratamientos por día de almacenamiento, la muestra HU-10 tuvo mayor actividad antioxidante ($p < 0.05$) en el día 0 con $19.85 \pm 1.59 \mu\text{mol Fe (II)/L}$, mientras que en el día 7 y 14 fue la muestra U-10 con 49.12 ± 1.30 y $35.21 \pm 1.12 \mu\text{mol Fe (II)/L}$, respectivamente.

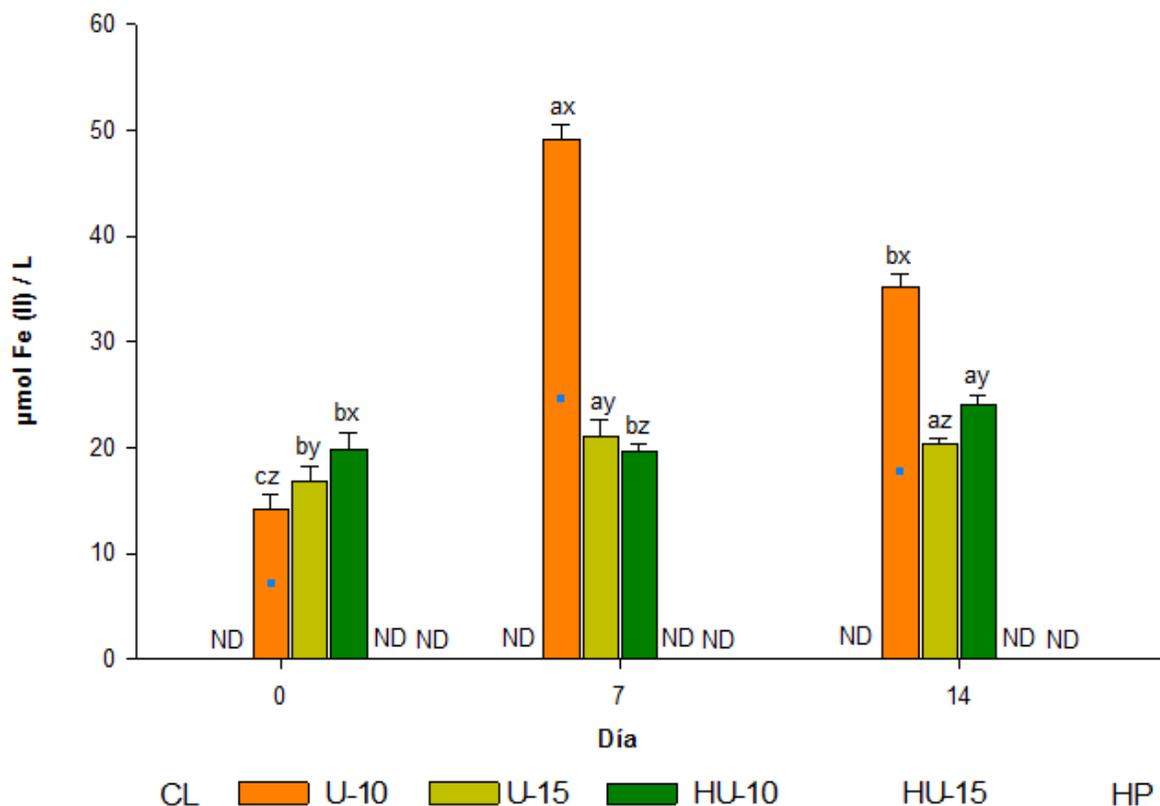


Figura 14 - Actividad antioxidante mediante FRAP de las diferentes muestras durante el almacenamiento. CL: Leche Control. U-10: Termoultrasonificada – 10 min. U-15: Termoultrasonificada – 15 min. HU-10: Homogenizada – Termoultrasonificada– 10 min. HU-15: Homogenizada – Termoultrasonificada– 15 min. HP: Homogenizada – Pasteurizada. ^{a-c} Distintos superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre días; ^{x-z} Distintos superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos. $\mu\text{mol Fe (II)/L}$: micromoles de hierro (II) por litro.

De acuerdo a Müller *et al.*, (2011), el α -tocoferol posee mayor capacidad de reducción de hierro que otros compuestos liposolubles antioxidantes, por lo tanto, los resultados obtenidos en la leche termoultrasonificada posiblemente pueden atribuirse directamente a la presencia de esta vitamina en leche. De manera general, el aumento presentado en la actividad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) en el último día de almacenamiento, puede estar relacionado a los valores altos obtenidos de fenoles (Figura 12).

9 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que en el análisis químico proximal, el contenido de grasa en las muestras disminuye significativamente durante el almacenamiento, mientras que los demás parámetros se mantienen.

La acidez titulable de las muestras es mayor que lo establecido por la NOM-155-SCFI-2012 y aumenta a través de los días, así como la densidad, ST y SNG, sin embargo estos últimos parámetros se mantienen dentro de la norma. La U-15 presenta la mayor estabilidad, todas las muestras termoultrasonizadas se ubican en el eje verde-amarillo, tienen mayor luminosidad en el día 14, mayor cromaticidad y saturación en el día 0, además la leche HU-10 presenta menor diferencia de color con el control y el pasteurizado.

En todas las leches termoultrasonizadas la fosfatasa alcalina es positiva, debido a la temperatura y tiempo de tratamiento, sin embargo, en mesófilos aerobios y enterobacterias la leche HU-15 tiene valores similares al pasteurizado, mientras que la leche U-10 muestra menor contenido de AF de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010 y NMX-F-700-COFOCALEC-2012, incluso por debajo de la leche pasteurizada.

Las leches termoultrasonizadas presentan valores de fenoles totales similares a la leche pasteurizada y mayores a la leche control, y destacan en actividad antioxidante con respecto al control.

La aplicación del termoultrasonido brinda similar calidad fisicoquímica y microbiológica que una pasteurización, pero mayor disminución de AFM₁ y mejor actividad antioxidante, por lo tanto representa una buena alternativa para su procesamiento.

10 RECOMENDACIONES

- En futuros estudios, se podría aplicar un tratamiento con termoultrasonido incrementando la amplitud pero conservando las mismas condiciones de temperatura, con la finalidad de inactivar la enzima fosfatasa alcalina.
- Debido a que la técnica de cuantificación de aflatoxinas solo toma en cuenta las aflatoxinas libres, sería conveniente medir la bioaccesibilidad de la misma para determinar si durante el proceso digestivo se liberan más de estos compuestos.
- Hacer estudios más profundos para verificar el incremento de las aflatoxinas durante el almacenamiento.

11 REFERENCIAS

- Abdullah, N. y Chin, N. L. (2014). Application of thermosonication treatment in processing and production of high quality and safe-to-drink fruit juices. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 320-327. DOI: 10.1016/j.aaspro.2014.11.045.
- Aday, M. S., Temizkan, R., Büyükcan, B. y Caner, C. (2012). An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound. *LWT-Food Science and Technology*, 52(2), 93–101. DOI:10.1016/j.lwt.2012.09.013.
- Aldubhany, T. A. W., Gouda, E., Khattab, A. y Dabour, N. (2014). Effects of Storage on Some Physico-Chemical Characteristics of UHT Milk Stored at Different Temperature. *Alexandria Science Exchange*, 35(2), 108. ISSN 1110 – 0176.
- AOAC (1999). “Official Methods of Analysis of AOAC International”; 920.151 (Solids (Total) in fruits and fruits products); 940.26 (Ash of fruits and fruit products); 942.15 (Acidity (Titratable) of fruit products).16^a ed.
- AOAC (2000). “Official Methods of Analysis of AOAC International”. Fat determination.17^a ed. Gaithersburg, USA.
- AOAC (2005). “Official Methods of Analysis of AOAC International”; 991.20: Protein in fruit products Kjeldahl method.
- Badui, D. S. (2013). Capítulo 4 Leche y productos lácteos. En: *Química de los alimentos*. México: Editorial Pearson. 73.
- Bakirci, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12(1), 47-51. DOI: 10.1016/S0956-7135(00)00020-7.
- Bañuelos, M. T. Á., Moreno, M. C., Peón, N. R. y Rojo, F. (2000). Aductos-ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Revista Cubana Oncológica*, 16(1), 35-9. ISSN: 1561-3089. DOI: onc07100.

- Barquero, H. Z. (2009). Aflatoxinas B₁ y su asociación con el cáncer de hígado. *Acta Médica Costarricense*. 46(4). ISSN 0001-6012.
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Composition properties, physicochemical characteristics and shelf life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. *Journal of Food Quality*, 32(3), 283-302. DOI:10.1111/j.1745-4557.2009.00250.x.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M. G., Mawson, R. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 172-178. DOI: 10.1016/j.ifset.2008.11.005.
- Bhat, R., Rai, R. V. y Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x.
- Bolufer, P. (2012). *Las altas presiones*. Industria Alimentaria: Interempresas. Recuperado de <http://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/80511-Las-altas-presiones.html>.
- Bucevic-Popovic, V., Delas, I., Medugorac, S., Pavela-Vrancic, M. y Kulisic-Bilusic, T. (2014). Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 394-401. DOI:10.1111/1471-0307.12126.
- CANILEC (Cámara Nacional de Industriales de la Leche). (2011). Libro Blanco de la Leche y los productos Lácteos. D.F, México: Litho Offset Imprenta.
- Capilla, M. F. (2015). *Construcción y evaluación de un pasteurizador solar-prototipo para leche de vaca*. Tesis de Maestría. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/16818/CAPILLA%20MORENO%20FERNANDO-%20B120943.pdf?sequence=1>.

- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-ADN. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16 (2), 109-120. ISSN: 2395-8723.
- Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo, F. y Méndez, I. (2003). Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *Journal of Food Protection*, 66(10), 1885-1892. DOI: 10.4315/0362-028X-66.10.1885.
- Chambers, D. H., Esteve, E. y Retiveau, A. (2010). Effect of milk pasteurization on flavor properties of seven commercially available french cheese types. *Journal of Sensory Studies*, 25(4), 494-511. DOI:10.1111/j.1745-459X.2010.00282.x.
- Chemat, F. y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- Chen, H. Y., Lin, Y. C. y Hsieh, C. L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104(4), 1418-1424. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.02.004.
- Chen, J. G. y Zhang, S. W. (2011). Liver cancer epidemic in China: past, present and future. In *Seminars in cancer biology*. Academic Press. 21(1), 59-69. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.11.002-.
- Chen, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton, L. y Akesson, B. (2003). Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13(12), 927-935. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)001390.
- Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C. y Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104(4), 1396-1401. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.02.001
- Cheng, Z., Moore, J. y Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429-7436. DOI: 10.1021/jf0611668.

- Coria, Y. S., Ochoa M. J. y Nazareno, M. A. (2011) Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia sp.* fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126(2). 514-519. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.033.
- Cruz-Cansino, N. D. S., Reyes-Hernández, I., Delgado-Olivares, L., Jaramillo-Bustos, D. P., Ariza-Ortega, J. A. y Ramírez-Moreno, E. (2016). Effect of ultrasound on survival and growth of *Escherichia coli* in cactus pear juice during storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 431-437. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.014.
- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. y Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40(6), 725-732. DOI: 10.1016/j.foodres.2007.01.003.
- Dande, S. y Manchala, R. (2011). Antioxidant and phenolic content of nuts, oil seeds, milk and milk products commonly consumed in India. *Food and Nutrition Sciences*, 2(5), 422-427. DOI:10.4236/fns.2011.25059.
- De La Cruz, R., S. N. y Roncal, R., J. C. (2014). Conservación de alimentos mínimamente procesados. Tesis de Ingeniería Química. Recuperado de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3563>.
- De São José, J. F. B., De Andrade, N. J., Ramos, A. M., Vanetti, M. C. D., Stringheta, P. C. y Chaves, J. B. P. (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*, 45, 36-50. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.04.015.
- Elrahman, A., Ahmed, S. M., Mohamed, A. M. E., Zubeir, E. y El Owni, O. A. (2015). Effect of Storage Temperature on the Microbiological and Physicochemical Properties of Pasteurized Milk.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2012). Recuperado de: <http://www.efsa.eu.int/science/contam/contamopinions/294/opinioncontam02nfina11.pdf>.

- El-Sayed, Y. S. y Khalil, R. H. (2009). Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 47 (7), 1606-1609. DOI: 10.1016/j.fct.2009.04.008.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2017). *Producción y productos lácteos*. Recuperado de: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/composicion-de-la-leche/es/#.WQKoUmmGNdg>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). (2007). *Milk and Milk Products*. Recuperado de: <http://www.fao.org/Wairdocs/X5434E/x5434e0d.htm>.
- FEN (Fundación Española de Nutrición) y FINUT (Fundación Iberoamericana de Nutrición). (2015). *La leche como vehículo de salud para la población*. Recuperado de: http://www.inlac.es/admin/uploads/files/id_18122821_el_valor_de_la_leche_fundacion_espanola_nutricion.pdf.
- Fernandes, A. M., Corrêa, B., Rosim, R. E., Kobashigawa, E. y Oliveira, C. A. F. (2012). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 24(1), 104-108. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.09.010.
- Fernandez, E. E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos *Universidad Autónoma de Querétaro*. México, 27, 28-29.
- Francis, F. J. (1980). *Color quality evaluation of horticultural crops*. *Hort Science* (USA), 1(15), 1-20. ISSN: 0018-5345.
- García, I. C. y Panadero, A. N. (2012). Factores que influyen en la composición nutricional de la leche. *Revista Ciencia Animal*, (5), 73-85. DOI: 1320/1206.
- García, M., Shin, J. H., Schlaefli, A., Greco, L. F., Maunsell, F. P., Santos, J. E. P. y Thatcher, W. W. (2015). Increasing intake of essential fatty acids from milk replacer benefits performance, immune responses, and health of preweaned Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 458-477. DOI: 10.3168/jds.2014-8384.

- García, C. A. C., Montiel, R. L. A. y Borderas, T. F. (2014). Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Archivos de Zootecnia*, 63(241), 85-105. ISSN: 1885-4494.
- García, M. L., Burgos, J., Sanz, B. y Ordoñez, J. A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 67(6), 619-628. ISSN 0185-3309.
- Gabriel, A. A. (2012). Microbial inactivation in cloudy apple juice by multi-frequency Dynashock power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 346-351. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2011.06.003.
- Gaucher, I., Mollé, D., Gagnaire, V. y Gaucheron, F. (2008). Effects Of Storage Temperature On Physico-Chemical Characteristics Of Semi-Skimmed UHT Milk. *Food Hydrocolloid*. 22(1), 130–143. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2007.04.007.
- Gutiérrez, A. L. F. (2011). Curso tecnología de leche y derivados. Módulo 1: Secreción de la leche, composición y propiedades. *Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (115).
- Hassan, A., Amjad, I. y Mahmood, S. (2009). Microbiological and physicochemical analysis of different UHT milks available in market. *African Journal of Food Science*, 3(4), 100-106. DOI: EA59F1020197.
- Hernández-Delgado, S., Reyes-López, M. Á., García-Olivares, J. G., Mayek-Pérez, N. y Reyes-Méndez, C. A. (2007). Incidencia de hongos potencialmente tóxicos en maíz (*Zea mays L.*) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(2), 127-133. ISSN 0185-3309.
- Herrero, A. M. y Romero de Ávila M. D. (2016). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 50(4), 71.
- Herrera, Q. L. (2012). *Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales*. Tesis de Maestría. Recuperado de: <https://zaguan.unizar.es/record/8955?ln=es>.

- IDF, (International Dairy Federation Bulletin No. 254). (1991). Consumption statistics for milk and milk products.
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A. y Trucksess, M. W. (2013). Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control*, 29(1), 1-6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.058.
- INEN, (Instituto Ecuatoriano de Normalización), (1973), Leche Pasteurizada: Ensayo de la fosfatasa, pp. 2.
- Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal Dairy Science*, 85: 295-350. DOI: 10.3168/jds.S00220302(02)740794.
- Juraga, E., Sobota S. B., Herceg, Z. y Rezek J., A. (2011). Application of high intensity ultrasound treatment on *Enterobacteriae* count in milk. *Mljekarstvo*, 61(2), 125-134. DOI: 69084.
- Karmowski, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M. y Böhm, V. (2015). Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. *Food Chemistry*, 175, 593-600. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.12.010
- Kentish, S. y Feng, H. (2014). Applications of power ultrasound in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 263-284. DOI: 10.1146/annurev-food-030212-182537.
- Kirk, R.S., Sawyer, R. y Egan, H. (2011). Capítulo 4, Análisis de lácteos. En: Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2ª Edición. (Ed) Patria México. 40
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J. y Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(13), 3713-3717. DOI: 10.1021/jf020071c.

- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. y Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261-266. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.12.001
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food technology (USA)*, 47(4), 2-14. DOI: US9409301.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M. y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693. DOI: 10.1590/S0101-20612004000400036.
- Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H. y Martin, S. E. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93(3), 354-364. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.01.037.
- Lindmark-Mansson, H. y Akesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 103-110. DOI: 10.1017/S0007114500002324.
- López, Y., Noa, M., Medina, M. S., Noa, E., Landeros, P., Juárez, C. y González, D. G. (2012). Niveles de aflatoxina M₁ en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Revista de Salud Animal*, 34(1), 40-45. DOI: 123456789/62478.
- Mahaut, M., Romain J., Brulé G. y Schuck P. (2003). *Productos Lácteos Industriales*. Acribia, España. 55.
- Mahmood, A. y Usman, S. (2010). A comparative study on the physicochemical parameters of milk samples collected from buffalo, cow, goat and sheep of Gujrat, Pakistan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(12), 1192-1197. DOI: 10.3923/pjn.2010.1192.1197.
- Mason, T. J., Paniwnyk, L. y Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253-S260.
- Mataix, V. J., Rivas-Gonzalo. J. C. (2013). Capítulo 14 Leche y derivados lácteos. En: *Tratado de nutrición y alimentación*. México: Océano.391-395.

- Meyer, M. R. (2014). Elaboración de productos lácteos. México: Trillas. 12-18.
- Mohammad, M., S., Mohamadi, S., Ali. y Mohsenib, S. (2015). Destruction of AFT by Ultrasound Treatment. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4(11S), 198-202.
- Morales, F. J. y Jiménez-Pérez. S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72(1), 119-125. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00239-9.
- Montes, G. N., Reyes, M. C. A., Montes, R. N. y Cantú, A. M. A. (2009). Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays L.*) grain used as food and animal feed. *CyTA—Journal of Food*, 7(2), 119-125. DOI: 10.1080/19476330902940432.
- Müller, L., Fröhlich, K. y Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.04.045
- Normas Mexicanas NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Sistema Producto Leche, Alimento Lácteo, Leche Cruda De Vaca. Especificaciones Fisicoquímicas, Sanitarias y Métodos De Prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
- Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
- Norma Oficial Mexicana: NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana: NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

- O'Connell, J.E. y Fox, P.F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 11(3), 103-120. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00033-4.
- Ordoñez, J. A., Aguilera, M. A., García, M. L. y Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research*, 54(01), 61-67. DOI: 10.1017/S0022029900025206.
- Ortiz, C. M. F., Portilla, L. B. H. y Medrano, J. V. (2012). Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 44(2), 247-256. DOI: 10.22319/rm251744.
- Park, D. L. (2002). Effect of processing on aflatoxin. *Mycotoxins and Food Safety*. 504, 173–179. DOI: 10.1007/978-1-4615-0629-4_17.
- Pathare, P. B., Opara, U. L. y Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60. DOI: 10.1007/s11947-012-0867-9.
- Pereda, J. (2012). Tesis Doctoral: *Uso de la Tecnología de Ultra Alta Presión por Homogeneización (UHPH) en la obtención de leches de larga conservación*. Recuperado de: http://www.tesisred.net/bitstream/handle/10803/5704/jp1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y_
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B. y Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1081-1093. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3.
- Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M. y Escobar, A. (2008). Ocurrencia de aflatoxina M₁ en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano. *Revista de Salud Animal*, 30(2), 103-109. ISSN 2224-4700.

- Pérez-Lizaur, A. B., Palacios G. B., Castro B. A. L. y Flores G. I., (2014). *Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes*. México. Fomento de nutrición y salud.83-87.
- Pérez-Reyes, M. y Sosa-Morales, M. (2013). Mecanismos de transferencia de calor que ocurren en los tratamientos térmicos de alimentos. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*. 7(1), 37-47.
- Picart, L., M. Thiebaud, M. Rene, J. P. Guiraud, J. C. Cheftel y Dumay, E., (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*. 73(4), 454–463. DOI: 10.1017/S0022029906001853.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S. y Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. *Food Control*, 31(2), 593-606. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.039.
- Pitt, W. G. y Ross, S. A. (2003). Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnology Progress*, 19(3), 1038-1044. DOI: 10.1021/bp0340685.
- Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00075-8.
- Power, O., Jakeman P. y Fitz-Gerald, R., J., (2012). Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*. 44(3), 797-820. DOI: 10.1007/s00726-012-1393-9.
- Puttongsiri T. y Haruenkit. R., (2010) Changes in ascorbic acid, total polyphenol, phenolic acids and antioxidant activity in juice extracted from coated kiew wan tangerine during storage at 4, 12 and 20 °C. *Natural Science*. 44, 280-289. DOI:10.4236/ajac.2015.65037.
- Quevedo-Garza P. A., Trujillo M., A. J. y Cantú M., P. C. (2015). Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M₁ en muestras de leche

- procedentes de Monterrey (México). Tesis Doctoral. Recuperado de:<http://www.tdx.cat/handle/10803/286289>.
- Rademacher, B. y Hinrichs, J. (2006). Effects of high pressure treatment on indigenous enzymes in bovine milk: Reaction kinetics, inactivation and potential application. *International Dairy Journal*, 16(6), 655–661. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.021.
- Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S. y Lopez-Hernandez, A. (2010). Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5538-5551. DOI: 10.3168/jds.2010-3400.
- Robles-Ozuna, L. E. y Ochoa-Martínez, L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109-122. DOI: 81325441002.
- Romero, E. A. R., Martínez, L. A. O. y Castro, J. M. (2016). Efecto del tratamiento con ultrasonido sobre las propiedades funcionales y estructurales de almidón procedente de diversas fuentes: una revisión. *Revista Biotecnia*, 18(2), 16-23. DOI: 10.18633/bt.v18i2.275.
- Rustom, I. Y. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57-67. DOI: 10.1016/S0308-8146(96)00096-9.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., López, P. y Raso, J. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. *New methods of food preservation*. 176-204. DOI: 10.1007/978-1-4615-2105-1_9.
- Santos, M. A. (2012). Capítulo 2, Características de la leche. En: *Leche y sus derivados*. México: Trillas, pp. 130.
- Schwechheimer, C. y Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(10), 605. DOI: 10.1038/nrmicro3525.
- SIAP-SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2016). *Panorama de la Lechería en México: diciembre del 2016*:

Recuperado

de:

http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Diciembre2016.pdf

- Serra, M., Trujillo, A. J., Jaramillo, P. D., Guamis, B. y Ferragut, V. (2008). Ultra-high pressure homogenization-induced changes in skim milk: impact on acid coagulation properties. *Journal of dairy research*, 75(01), 69-75. DOI: 10.1017/S0022029907003032.
- Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G., J. y Mount J. (2003). Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocolloids*, 17(2), 191-197. DOI: 10.1016/S0268-005X (02)00051-6
- Smith, E. A. y Macfarlane, G. T. (1996). Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 81(3), 288-302. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x.
- Soria, A. C. y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323-331. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.04.003.
- Steyn, P. S. y Stander, M. A. (1999). Mycotoxins as causal factors of diseases in humans. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 18(3-4), 229-243. DOI: 10.3109/15569549909009255.
- Stintzing, F. C., Schieber A y Carle R. (2001). Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*, 212 (4), 396-407. DOI: 10.1007/s002170000219.
- Stokes, S. R., Jordan, E. R., Loofer, M. y Waldner, D. (2000). Managing Milk Composition: Evaluating Herd Potential. *Texas Farmer Collection*. DOI: 1969.1/86967.
- Tabari, M., Tabari, K. y Tabari, O. (2013). Aflatoxin M₁ determination in yoghurt produced in Guilan province of Iran using immunoaffinity column and high-

performance liquid chromatography. *Toxicology and industrial health*, 29(1), 72-76. DOI: 10.1177/0748233712446729.

Taverna, M., A. (2007) *Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad: Documento técnico para profesionales del sector lácteo*. Santa Fé, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de:<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AR2008000023>.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. y Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 669-675. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.01.003.

Ulloa, J. A., Ulloa, P. R., Ramirez, J. C. R. y Rangel, B. E. U. (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Revista Fuente Nueva Época*, 4(14). ISSN 2007 – 0713.

Urbán, G., Pérez, J., Martínez, F., Gutiérrez, R., Vega, S., Coronado, M. y Escobar, A. (2010). Aflatoxina M₁ en leche y queso de cabra producidos en Apaseo El Grande, Guanajuato, México. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 84-88. DOI: S0253-570X2010000200003.

Urrego N., J. R. y Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54(2), 108-116. ISSN: ISSN 0120-0011.

USDA. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Recuperado de: <https://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm545175.pdf>

Vásquez-Mazo, P. (2015). *Efecto de la combinación de luz ultravioleta y temperatura en el procesamiento de leche y derivados*. Tesis Doctoral. Recuperado de: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5846_VasquezMazo.pdf.

Velázquez, W. R., Martínez, S. P., Espinosa, V. H. I., Vera, M. A. N., Velázquez, E. W. R. y Pala, E. D. L. (2012). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en

- leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 47(2), 223-230. DOI: 10.22319/rmcpv%251474.
- Villafuerte, P. (2016). Características de la leche. Academia. edu. Recuperado de: https://www.academia.edu/8367776/Cap%C3%ADtulo_1_Caracter%C3%ADsticas_de_la_leche.
- Villamiel, M. y De Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478. DOI: 10.1021/jf990181s.
- Vinson, A. J., Su, X. H., Zubik, L. y Bose, P. (2001). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5315-5321. DOI: 10.1021/jf0009293.
- Wallace, T. C. y Giusti, M. M. (2008). Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73(4), C241-C248. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00706.x.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. y Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. DOI:10.3168/jds.2016-10974.
- Wilches, R. S. (2015). Tecnologías no térmicas en el procesado y conservación de alimentos vegetales. Una revisión. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 2(1), 73-82. DOI: 10.23850/24220582.172.
- Wrigley, D. M. y Llorca, N. G. (1992). Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. *Journal of Food Protection*, 55(9), 678-680. DOI: 10.4315/0362-028X-55.9.678.
- Yang, B., Zhao, M., Shi, J., Yang, N. y Jiang, Y. (2008). Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chemistry*, 106(2), 685-690. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.031.
- Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N. S., Quintero-Lira, A., Gómez-Aldapa, C. A., Alanís-García, E., Cervantes-Elizarrarás, A. y Ramírez-Moreno, E. (2016). Application of

Ultrasound in a Closed System: Optimum Condition for Antioxidants Extraction of Blackberry (*Rubusfruticosus*) Residues. *Molecules*, 21(7), 950. DOI: 10.3390/molecules21070950.

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.06.006.

12 ANEXOS

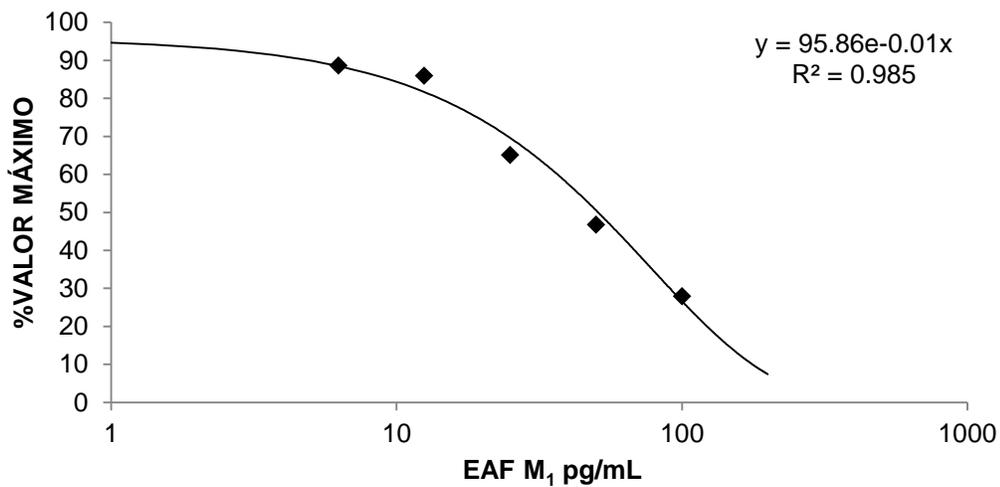


Figura 15 - Curva de calibración de aflatoxina M₁

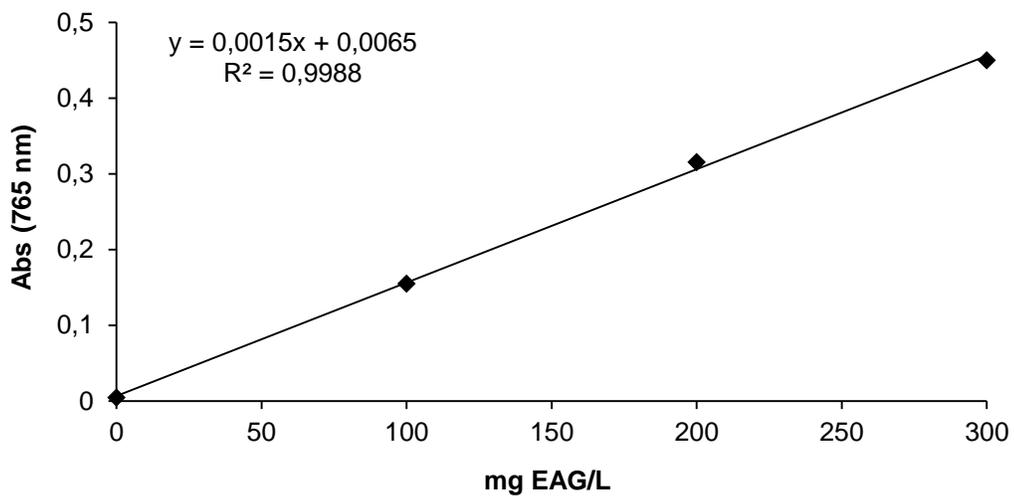


Figura 16 - Curva de calibración de ácido gálico para fenoles totales

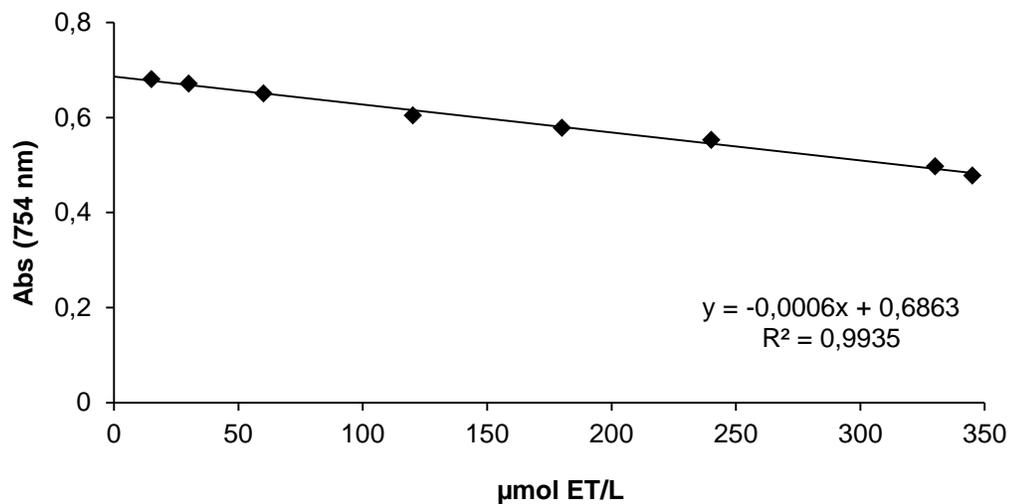


Figura 17 - Curva de calibración de TROLOX para el ensayo ABTS⁺⁺

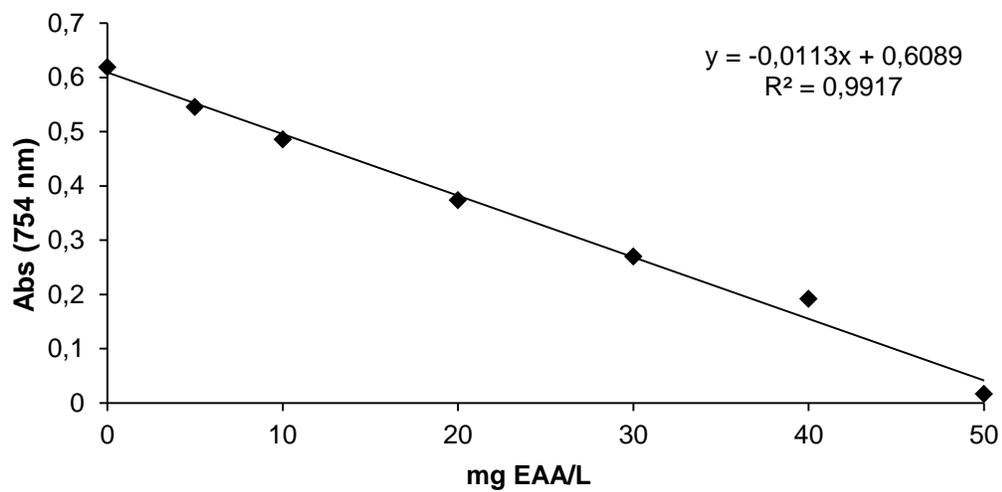


Figura 18 - Curva estándar de ácido ascórbico para el ensayo ABTS⁺⁺

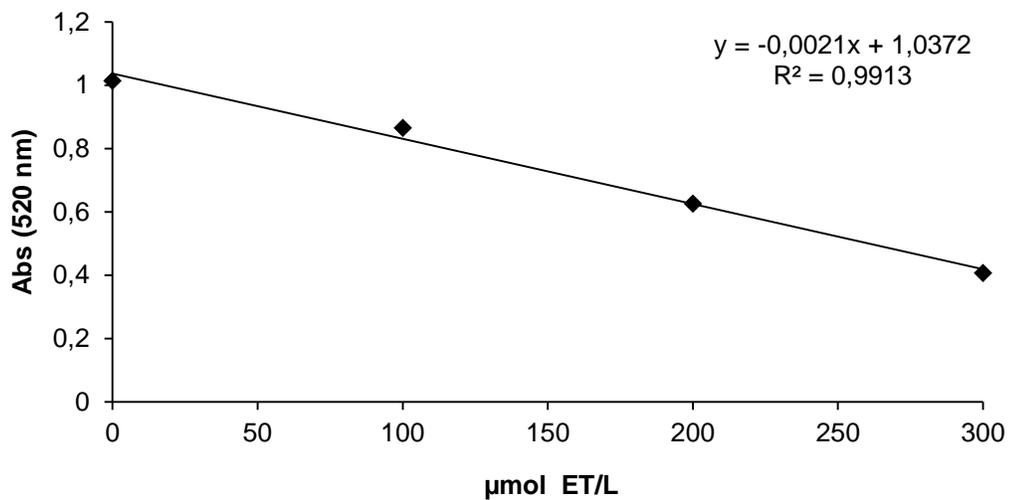


Figura 19 - Curva de calibración de TROLOX para el ensayo DPPH⁺

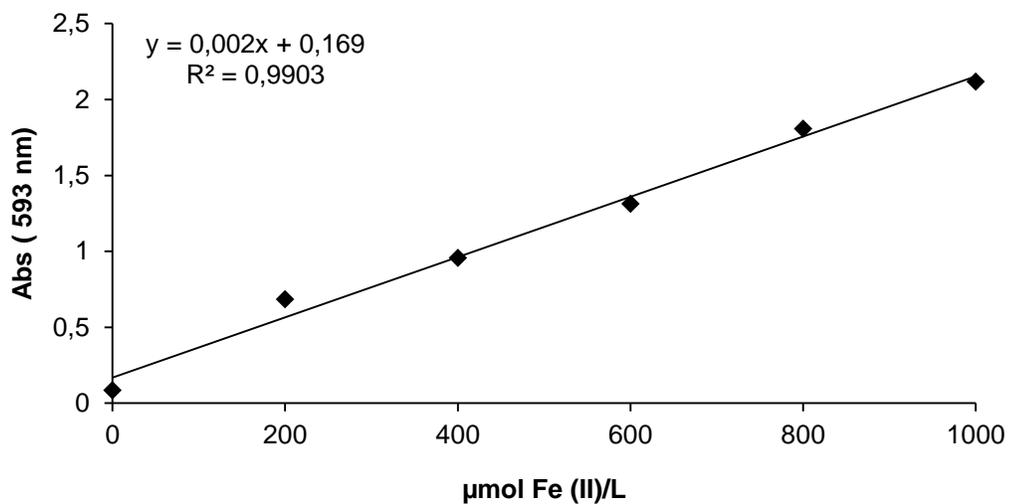


Figura 20 - Curva de calibración de Fe (II) para el ensayo FRAP