



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

**Desarrollo y escalado del proceso de producción de un queso de
pasta blanda *light* funcional debido a la incorporación de
fitoesteroles y fortificado con alfa-tocoferol como aditivo
antioxidante**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Industrial

Ing. Sergio Aníbal Rizzo

Director de Tesis: **Dra. Ana María Luisa Rojas.**
Director de Tesis: **Dra. Adriana María Descalzo.**
Consejero de Estudios: **Dra. Sandra Norma Guerrero.**

Lugar de Trabajo: Área Bioquímica, Nutrición y Compuestos Funcionales.
Instituto de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria (ITA-INTA), Castelar, Morón, Provincia de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2021.

Desarrollo y escalado del proceso de producción de un queso de pasta blanda *light* funcional debido a la incorporación de fitoesteroles y fortificado con alfa-tocoferol como aditivo antioxidante

Las enfermedades crónicas no transmisibles constituyen un problema de salud pública. En la actualidad, se estima que alrededor del 40 % de la población adulta mundial presenta elevados niveles de colesterol en sangre, con un total de 4.4 millones de muertes anuales. El objetivo principal del presente trabajo fue obtener un producto comercial a escala industrial orientado a satisfacer las demandas de los consumidores en lo que compete a la prevención de enfermedades asociadas al colesterol. Esta tesis implicó, específicamente, el desarrollo y escalado del proceso de producción de un queso de pasta blanda descremado o *light* funcional debido a la incorporación de fitoesteroles. Además, resultaría finalmente fortificado con alfa-tocoferol, el cual debió ser agregado con el primordial objetivo de actuar como preservador antioxidante. Este tipo de quesos es novedoso en Argentina y hay muy pocos desarrollos a nivel mundial. La tesis se llevó a cabo en el marco del proyecto FONARSEC FITS 2010 - "Desarrollo de alimentos lácteos funcionales 0004", de vinculación entre el grupo del "Laboratorio de Vitaminas, Antioxidantes y Compuestos Funcionales" del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) del INTA-Castelar (Morón, provincia de Buenos Aires) como sector científico-tecnológico y la empresa PyME "CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A." (Villa María, provincia de Córdoba).

Para planificar y plantear el desarrollo del producto funcional se utilizó el modelo Technology Readiness Level (TRL), el cual permite evaluar la madurez alcanzada por una tecnología particular y la comparación consistente entre los niveles de madurez alcanzados por diferentes tipos de tecnología. Seguidamente, se realizó una encuesta de consumidores donde se determinó sensorialmente cuál queso descremado de aquellos producidos regularmente por la empresa ("mozzarella" *light* o Por Salut *light*) preferían, en base a cuyos resultados se seleccionó el tipo de queso descremado o *light* a utilizar como base para el agregado de los fitoesteroles, de tal manera de asegurar su consumo saludable. El mismo fue el queso Por Salut *light*.

A continuación, se investigó la forma por la cual incorporar a la tina quesera cada tipo de fitoesteroles provistos por el mercado, libres, emulsionados y esterificados. Se evaluaron procedimientos posibles para su incorporación en forma homogénea a la matriz del queso resultante, en principio realizando este ensayo a escala laboratorio (tina quesera de 1 litro). En simultáneo se analizaron distintos vehículos (leche y crema) para la dispersión de cada tipo de fitoesteroles ensayados (libres, emulsionados y esterificados), determinando la homogeneidad de la incorporación final en la matriz del queso. Esto es fundamental ya que la porción mínima diaria de un alimento funcional debe asegurar la provisión precisa de la dosis de compuesto activo que ejerce su efecto en marcadores bioquímicos específicos del organismo.

Luego se repitió el mismo ensayo en leche y en crema como vehículos a escala piloto (180 litros), pero ya del tipo de fitoesteroles seleccionado por su desempeño a escala laboratorio, esto es, los esterificados. Se calculó el balance de masa correspondiente, introduciendo en él las variables que podían afectarlo y que resultaba de interés controlar en función de las características y composición del queso final obtenido. Se determinó químicamente la recuperación de los fitoesteroles esterificados

finalmente usados, de los tocoferoles y de los parámetros lactológicos de los quesos. Una vez que se definieron las condiciones óptimas de elaboración a escala piloto, se pasó a la escala industrial (2500 litros) en la planta de la empresa CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A. Se calculó el balance de masa correspondiente a esta escala mayor.

Los ensayos realizados mostraron que, por un lado, los fitoesteroles tuvieron una recuperación mayor al 90% en el producto industrial y, por el otro, que los fitoesteroles se mantuvieron estables a lo largo de la vida útil del queso.

El desafío tecnológico consistió en la adición de una cantidad de fitoesteroles suficiente para ejercer el efecto hipocolesterolémico con una ingesta diaria para ello establecida por el organismo oficial europeo en dos gramos. En consecuencia, el queso debía contener al menos 3,5 g de fitoesteroles esterificados cada 100 g de queso, homogéneamente distribuidos en cada dos porciones de 30 g cada una del queso, generándose así un exceso de lípidos susceptibles de sufrir oxidación, ya que los ésteres aportan una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados. Debido a ello, el agregado de alfa-tocoferol resultó ser una estrategia de doble propósito. Por un lado, se determinó que protegió al producto de la oxidación durante su madurado (21 días) y vida útil extendida que llegó hasta los 90 días posteriores a la elaboración y, en simultáneo, sirvió como fuente de vitamina E.

Los fitoesteroles esterificados se incorporaron exitosamente en el queso, sin que se evidenciara un defecto visual en el color o la estructura del mismo, determinándose además en forma analítica la distribución homogénea de los mismos en las distintas porciones (30 g cada una) de la horma. Los estudios de microscopía láser confocal permitieron evidenciar una dispersión homogénea de la fase lipídica en la matriz continua proteica del queso.

Los estudios microbiológicos demostraron que los quesos fueron aptos para su consumo hasta el fin de la vida útil determinada a nivel comercial (60 días) y la vida útil extendida (90 días).

Mediante análisis de componentes principales se determinó que los quesos funcionales fueron diferentes a los quesos control, asociándose la población funcional a la presencia de antioxidantes naturales (alfa y beta tocoferoles), a las mayores concentraciones de ácidos grasos insaturados, de omega-6 y, en particular, al contenido (aumentado) del ácido graso esencial linolénico, influyendo el tiempo de maduración en las características del queso.

El producto obtenido está a la venta en la actualidad a través de los canales e-commerce de la empresa y en distintos comercios, estando a la vez registrado bajo el número otorgado por la autoridad sanitaria de la provincia de Córdoba, Registro Nacional de Productos Alimenticios (RNPA) nº 04064284 y protegido por una patente (INPI Nº 20150101287) que involucra no solamente al producto, sino también la metodología para lograrlo.

Palabras clave: Alimentos funcionales, queso Por Salut descremado o *light*, queso Por Salut funcional, fitoesteroles esterificados, escalado planta piloto, escalado industrial, alfa-tocoferol, antioxidantes naturales, estabilidad oxidativa, ácidos grasos, vida útil, pequeñas y medianas empresas (PyMEs).

Development and scaling up of the process for production of a light functional soft cheese due to the addition of phytosterols and fortified with alpha-tocopherol as antioxidant additive

Noncommunicable diseases (NCDs) constitute a public health problem. Currently, around 40% of the world's adult population presents elevated blood cholesterol levels, which produce annually 4.4 million of deaths. The main objective of the present work was to obtain on an industrial scale a commercial product that satisfies the demands of consumers regarding the prevention of diseases associated with abnormal cholesterol levels. This thesis involved, specifically, the development and scaling up of the production process of a low-fat or light functional soft cheese due to the incorporation of phytosterols. In addition, it would be finally fortified with alpha-tocopherol, which had to be added with the primary objective of acting as an antioxidant preservative. This type of cheese is a novelty in Argentina and there are very few developments worldwide. This thesis was carried out with a FONARSEC project (FITS 2010 - "Desarrollo de alimentos lácteos funcionales 0004") by which an association between the scientific-technological group of the "Laboratorio de Vitaminas, Antioxidantes y Compuestos Funcionales" (Instituto de Tecnología de Alimentos, ITA, INTA-Castelar, Morón, provincia de Buenos Aires) and the SME company "CDS-Lácteos Capilla del Señor SA" (Villa María, province of Córdoba) was developed.

The Technology Readiness Level (TRL) model was used to organize the development of the functional product. It allows evaluating the maturity achieved by a particular technology and the consistent comparison between the maturity levels achieved by different types of technology. Afterwards, a consumer survey was conducted to determine sensorily which skim cheese regularly produced by this company ("mozzarella" light or Por Salut light) they preferred. Based on the results obtained, the Por Salut light cheese was selected for adding phytosterols.

Possible procedures for the incorporation of phytosterols in a homogeneous way into the matrix of the resulting cheese were evaluated, initially carrying out this test on a laboratory scale (1 liter cheese tub). Simultaneously, different vehicles (milk and cream) were analyzed for the dispersion of each type of phytosterol sources tested (free phytosterols, emulsified phytosterols and esterified phytosterols), determining the homogeneity of the final incorporation within the cheese matrix. This is essential since the minimum daily portion of a functional food must ensure the precise doses of the active compound that exerts its effect on specific biochemical (clinical) markers. Emulsified phytoesterols were finally selected as the source of the bioactive for the development of the functional Port Salut light cheese.

The same study was then repeated in milk and cream vehicles at the pilot scale (180 liters), but already with the type of phytosterols selected after the performance shown at laboratory scale, that is, the esterified phytosterols. The corresponding mass balance was calculated, introducing in it the variables that could affect it and that were of interest to control, based on the characteristics and composition of the final cheese to be obtained. The recovery of the finally used esterified phytosterols, of the tocopherols and of the lactological parameters of the cheeses was determined. Once the optimal production conditions were defined on the pilot scale, the industrial plant scale-up was performed (2500

liters) at the CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A. company (Villa María, Córdoba). The mass balance corresponding to this larger scale was then calculated.

The assays carried out showed that, on the one hand, the phytosterols showed a recovery greater than 90% in the industrial product and, on the other, that the phytosterols remained stable throughout the shelf-life of the cheese.

The technological challenge consisted in the addition of a sufficient amount of phytosterols to exert the hipcholesterolemic effect, which involves a daily intake of 2 g as established by the official European authorities. Consequently, the cheese had to contain at least 3.5 g of esterified phytosterols per 100 g of cheese, homogeneously distributed for every 30 g of cheese (two portions = 60 g). Thus, an excess of lipids susceptible to oxidation was generated since the esters provide a high concentration of polyunsaturated fatty acids. Therefore, the addition of alpha-tocopherol had a dual-purpose strategy. On the one hand, it was determined that alpha-tocopherol protected the functional cheese product from oxidation during its maturation (21 days) and extended shelf-life up to 90 days post-processing and, on the other, it served for providing vitamin E.

The esterified phytosterols were successfully incorporated into the cheese without showing a visual defect in its color and appearance, and their homogeneous distribution was also determined analytically in different portions (60 g each). The confocal laser microscopy studies showed a homogeneous dispersion of the lipid phase in the protein network of the cheese.

The microbiological studies showed that the cheeses were suitable for consumption until the end of the shelf-life determined at commercial level (60 days) and until the end of the extended shelf life (90 days).

Through principal component analysis, it was determined that functional cheeses were different from control cheeses (without phytosterols), associating the functional population with the presence of natural antioxidants (alpha and beta-tocopherols) with the highest concentrations of unsaturated fatty acids, with the omega-6 and, in particular, with the increased content of the essential fatty acid linolenic acid. Also, ripening time influenced on the characteristics of the functional cheese.

The product obtained is currently sold by the company's e-commerce channel, as well as through different shops. The commercial registration number of the product was also obtained from the health authority of the province of Córdoba (National Product Registry Food, RNPA, Nº 04064284), and protected by a patent (INPI Nº 20150101287) that comprises not only the product, but also the methodology used for its production.

Keywords: Functional foods, low-fat functional Por Salut cheese, esterified phytosterols, scaling-up, alpha-tocopherol, natural antioxidants, oxidative stability, fatty acids, shelf-life, small and mid-size enterprises (SMEs).

A mi compañera Betiana y mis hijos que son la razón de mi vida
A mi Mamá, que siempre me guía desde donde sea que esté
A mi Papá por estar siempre a mi lado
Y a toda la familia que hay a mi lado

Quiero agradecer de manera especial mi directora por parte de la Universidad de Buenos Aires, la Dra. Ana María Rojas por brindarme su apoyo, su ayuda, confianza y dedicación por las enseñanzas durante estos años, por su calidad humana.

Además, agradecer a la Dra. Adriana María Descalzo mi directora de la tesis por parte del INTA, que siempre me brindó su ayuda oportuna y amistad.

Infinitas gracias a ambas por su esfuerzo, dedicación y paciencia.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Instituto de Tecnología de Alimentos del INTA-Castelar, que me abrió sus puertas y por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al Departamento de Industrias por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de tesis doctoral.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, que a través del fondo argentino sectorial (FONARSEC) me otorgó la beca doctoral y subsidió parte del desarrollo de la presente tesis.

A la empresa Lácteos Capilla del Señor S.A., a su gerente general Álvaro Ugartemendia, que nunca dudó de la asociación con el grupo de investigadores y formar el consorcio asociativo público-privado (CAPP).

A todo el capital HUMANO que conforma la empresa Lácteos Capilla del Señor S.A., a Favio Terreno, a Verónica Frossasco, que siempre respondieron a cada una de las consultas técnicas.

A la Dra. Gabriela Grigioni y a la Ing. Fernanda Paschetta del área de análisis físicos y sensoriales que participaron en este proyecto.

A todo el personal de la EEA-Rafaela, especialmente al Laboratorio de Calidad de Leche, Luciana Costabel, Gabriela Audero y Miguel Taverna por su participación en el proyecto y por haber brindado esta planta piloto para realizar los ensayos.

A las mis amigas del INTA (y de la vida) las Dras. Carolina Pérez y Luciana Rossetti, por su ayuda en los ensayos en el INTA y su gran amistad.

A todo el grupo de insurrectos del área de Bioquímica, Nutrición y Compuestos Funcionales del INTA-Castelar.

INDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	1
1.1. Colesterol	2
1.2. Fitoesteroles	5
1.2.1. Definición y conceptos generales	5
1.2.2. Función biológica.	7
1.2.3. Fuentes naturales de fitoesteroles	9
1.2.3.1. Aceites vegetales y cereales	9
1.2.4. Recuperación y producción de fitoesteroles y tocoferoles a nivel industrial	11
1.2.5. Empresas productoras de fitoesteroles y tocoferoles a nivel mundial y en Argentina	13
1.3. Alimentos funcionales	14
1.3.1. Conceptos y generalidades.....	14
1.3.2. Alimentos funcionales adicionados con fitoesteroles.....	15
1.3.2. Fitoesteroles y otros compuestos bioactivos liposolubles.....	18
1.4. Leche y productos lácteos.....	18
1.4.1. Composición química de la leche.....	19
1.4.1.1. α-Lactosa.....	24
1.4.1.2. Otros carbohidratos.....	24
1.4.1.3. Minerales y sales	25
1.4.1.4. Vitaminas	25
1.5. Oxidación y antioxidantes.....	27
1.5.1. Oxidación lipídica.....	28
1.5.2. Oxidación proteica.....	32
1.5.3. Antioxidantes alimentarios legislación	34
1.5.4. Tocoferoles como antioxidantes. La vitamina E.....	35
1.5.5. Beta-caroteno (pro vitamina A) y retinol (vitamina A).....	37
1.5.6. Medición de la oxidación	39
1.5.6.1. Valor peróxido (VP)	40
1.5.6.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances TBARS</i>)	40
1.6. Queso.....	41
1.6.1. Propiedades fisicoquímicas y microestructura del queso	43

1.6.2. Maduración del queso.....	45
1.6.3. Fase grasa en los quesos	47
1.6.4. Fase acuosa en los quesos	48
1.6.5. Efecto del pH	49
1.6.6. Efecto de la temperatura	49
1.7. Tipos de quesos producidos en Argentina	50
1.7.1. Quesos funcionales en la Argentina y en el mundo	52
2. Planteo de hipótesis.....	54
3. Objetivos	55
3.1. Objetivo general.....	55
3.2. Objetivos particulares	55
4. Materiales y métodos	57
4.1. Encuesta de consumidores	57
4.2. Descripción de la planta “CDS-Lácteos Capilla del Señor”.....	57
4.3. Componentes utilizados en las elaboraciones a las diferentes escalas	59
4.4. Descripción de la elaboración del queso “Por Salut” <i>light</i> (según protocolo Lácteos CDS-Capilla del Señor).....	60
4.5. Composición química. Determinaciones a nivel laboratorio, piloto e industrial.....	64
4.6. Ensayos de desempeño de FE (fitoesteroles)	66
4.7. Estrategias para la incorporación de fitoesteroles esterificados (FEE)	66
4.7.1. Adición de fitoesteroles Emulfit AE 3675® (FEEM)	67
4.7.2. Adición de fitoesteroles esterificados Advasterol Ester S® (FEE).....	67
4.7.3. Adición de fitoesteroles libres (FELL) Advasterol 95 IP®.....	67
4.7.4. Adición de los tocoferoles como aditivo antioxidante.....	68
4.8. Elaboración de quesos a escala laboratorio (1 litro de leche) bajos en grasa y con diferentes niveles de fitoesteroles esterificados (FEE; Advasterol Ester®)	68
4.9. Elaboración a escala piloto (tina 180 litros) bajos en grasa y con FEE (Advasterol Ester ®).....	71
4.10. Elaboraciones a escala industrial (tina 5000 litros) de queso Por Salut <i>light</i> y con adición de FEE (Advasterol Ester®) y tocoferoles	72
4.10.1. Estudios de almacenamiento	73
4.11. Fitoesteroles, tocoferoles y carotenoides: determinaciones analíticas.....	73
4.11.1. Extracción de fitoesteroles	73

4.11.2. Detección de fitoesteroles libres (FEL).....	74
4.11.3. Cuantificación de FEL.....	74
4.11.4. Validación del método para la detección de los fitoesteroles	74
4.11.4.1. Linealidad, rango y límite de cuantificación.....	75
4.11.4.2. Precisión y repetibilidad.....	75
4.11.4.3. Recuperación.....	76
4.11.5. Extracción simultanea de tocoferoles, β caroteno y retinol.....	76
4.11.6. Detección de tocoferoles, β caroteno y retinol.....	77
4.11.7. Cuantificación de tocoferoles, carotenoides y retinol	77
4.12. Determinación de la oxidación lipídica	78
4.12.1. Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	78
4.12.2. Detección de peróxidos lipídicos empleando la técnica del valor peróxidos (VP)	79
4.13. Determinación del perfil de ácidos grasos.....	79
4.14. Analisis microbiológico y ensayos de antibióticos	80
4.15. Microscopía confocal.....	81
4.16. Análisis estadístico.....	82
5. Resultados y discusión.....	83
5.1. Validación de la técnica cromatográfica para la detección y cuantificación de los fitoesteroles.....	83
5.1.1. Linealidad, rango y límite de detección	83
5.1.2. Precisión y repetibilidad.....	84
5.1.3. Recuperación	85
5.2. Linealidad, rango y límite de detección para la detección y cuantificación simultanea de tocoferoles, β caroteno y retinol	86
5.3. Etapas de madurez tecnológica (TRL: <i>Technology readiness levels</i>)	86
5.3.1. Planteo de las diferentes etapas de investigación y de madurez tecnológica	87
5.3.1.1. Definición de la matriz. Comparación queso Por Salut <i>light</i> vs queso Mozzarella <i>light</i>: Datos de preferencia de los encuestados (TRL 1 y TRL 2)	89
5.3.1.2. Análisis de etapas críticas para la adición de fitoesteroles al queso Por Salut <i>light</i>.....	94
5.4. Ensayos a nivel laboratorio. Etapas TRL 3 y 4	94
5.4.1. Caracterización analítica de los fitoesteroles a utilizar	94

5.4.2. Grasa total y perfil de ácidos grasos (AG) de los fitoesteroles esterificados (FEE).....	97
5.4.3. Ensayo de desempeño de los fitoesteroles (FE). Fitoesteroles en crema y leche emulando la adición al tanque pulmón (etapa 1).....	99
5.5. Elaboración de queso “Por Salut” <i>light</i> con fitoesteroles a escala laboratorio.....	102
5.5.1. Composición química de las leches crudas y estandarizadas al 1,9 % y 1 %.....	102
5.5.2. Elaboración de los quesos a escala laboratorio.....	103
5.5.3. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala laboratorio: Valor peróxido	109
5.5.4. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala laboratorio: TBARS	110
5.5.5. Discusión y conclusiones de las etapas TRL 3 y 4.....	111
5.6. Etapas TRL 5 y 6. Elaboración de queso “Por Salut” <i>light</i> con fitoesteroles a escala piloto	113
5.6.1. Elaboración a escala piloto	113
5.6.1.1. Balance de masa	114
5.6.1.2. Composición, pH y acidez de las leches crudas.....	117
5.6.1.3. Aspecto de los quesos obtenidos a escala piloto	119
5.6.1.4. Evolución del pH de los quesos de todas las elaboraciones	121
5.6.1.5. Composición y propiedades de los quesos	123
5.6.1.6. Compuestos bioactivos en quesos.....	124
5.6.1.7. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala piloto: Valor Peróxido.....	125
5.6.1.8. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala piloto: TBARS	126
5.6.2. Discusión y conclusiones de las elaboraciones a escala piloto Etapas TRL 5 y 6.....	127
5.7. Etapas TRL 6 a 8. Elaboración de queso “Por Salut” <i>light</i> con fitoesteroles a escala industrial.....	128
5.7.1. Balance de masa	128
5.7.10. Microestructura de los quesos producidos a escala industrial	153
5.7.11. Análisis de componentes principales (PCA)	156
5.7.2. Composición, pH y acidez de las leches crudas	129

5.7.3. Evolución del pH de los quesos de todas las elaboraciones.....	132
5.7.4. Composición y propiedades de los quesos.....	133
5.7.5. Humedad y compuestos bioactivos en los quesos.....	134
5.7.6. Perfil de ácidos grasos	142
5.7.7. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala industrial: TBARS.....	146
5.7.8. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala industrial: Valor peróxido	148
5.7.9. Vida útil de los quesos funcionales producidos a escala industrial.....	150
5.7.9.1. Medida de la oxidación lipídica durante el almacenamiento de quesos comerciales con bajo contenido de tocoferoles totales.....	150
5.7.9.2. Efecto de la adición de tocoferoles en los quesos producidos a escala industrial.....	151
5.8. Etapa TRL 9: Producto comercial	159
5.9. Discusión y conclusiones de las elaboraciones a escala industrial	
Etapas TRL 6 a 8.....	160
6. Conclusiones generales y perspectivas.....	162
7. Bibliografía	164
8. ANEXOS	185
8.1. Ficha técnica de fitoesteroles libres Advasterol 90 ® (FELL)	185
8.2. Ficha técnica de fitoesteroles libres Advasterol Ester ® (FEE)	187
8.3. Ficha técnica de fitoesteroles emulsificados EMULFIT AE 3675 ® (FEEM)..	189
8.4. Anexo IV. Ficha técnica Vitamina E natural SF 900 UI ®	189
8.5. Anexo V. Protocolo elaboración de blando bajo en grasa con fitoesteroles EEA- INTA Rafaela.....	192

Abreviaturas

AGPI: ácidos grasos poli-insaturados.

CDS: Empresa Lácteos Capilla del Señor.

ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles.

FE: Fitoesteroles.

FEL: Fitoesteroles libres.

FEE: Fitoesteroles esterificados.

FEEM: Fitoesteroles emulsificados.

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TBA: ácido tiobarbitúrico.

TF: Tocoferoles.

TRL's (*Technology Readiness Levels*): niveles de madurez tecnológica.

VP: valor peróxidos.

1. Introducción

En los últimos años, los cambios en los ritmos y estilos de vida de las grandes poblaciones han impactado directamente en los hábitos alimentarios, afectando la salud y la calidad nutricional de los alimentos que los individuos consumen. Asociado a estos cambios, se observó un incremento en la incidencia de pacientes con enfermedades crónicas como las cardiovasculares, la obesidad, la diabetes tipo 2 y el cáncer. Las mismas representan importantes problemas de salud pública (Nyberg et al., 2018). Un factor importante a tener en cuenta es el nivel plasmático total de colesterol y, además, la relación molar entre este nivel (mmoles/L) y el nivel de las lipoproteínas transportadoras (mmoles/L) de alta densidad (HDL) o de baja densidad (LDL), conocidas comúnmente como “colesterol HDL” o “colesterol bueno” y “colesterol LDL” o “malo”, respectivamente. La importancia de una concentración sérica elevada de colesterol total y, especialmente, del colesterol LDL radica en que constituye un factor de riesgo clave para el desarrollo de la aterosclerosis y de sus manifestaciones clínicas, que incluyen la enfermedad coronaria, las enfermedades cerebrovasculares y la arteriopatía periférica (da Silva et al., 2019). Estas enfermedades presentan una fisiopatología compleja y están asociadas a varios factores de riesgo ambiental (Aguilera et al., 2019; Mazloumi et al., 2019). La dieta es uno de los factores que juega un papel fundamental (GBD Diet Collaborators, 2017; GBD Diet Collaborators, 2019; Neuenschwander et al., 2019). Un patrón dietético occidentalizado, que abarca una alta ingesta de ácidos grasos trans, saturados y omega-6, carbohidratos refinados y sal, y una baja ingesta de productos vegetales, se asocia con un mayor riesgo de estas enfermedades (Christ & Latz, 2019; OMS, 2019).

En contraposición a esto, los patrones dietéticos saludables, compuestos por granos integrales, pescado rico en ácidos grasos omega-3 y frutas y verduras, protegen contra el desarrollo de enfermedades crónicas (Korakas et al., 2018). El consumo de estos alimentos, o de alimentos que contengan compuestos bioactivos como polifenoles, isotiocianatos, y terpenoides, se han asociado con la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (Cömert & Gökmen, 2018). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que estos compuestos alimentarios bioactivos (BFC, *bioactive food compounds*) ejercen sus efectos protectores actuando a través de diferentes metabolismos celulares y mecanismos moleculares (Ahangarpour et al., 2019; Avila-Sosa et al., 2019; Sharma et al., 2019; Sánchez-Crisóstomo et al., 2019).

En el mismo sentido, el uso de alimentos funcionales enriquecidos con fitoesteroles (FE) y fitoestanoles (FA) es una estrategia para reducir los niveles elevados de colesterol total y de LDL. En un meta análisis reciente Ghaedi et al. (2020) reportaron que la ingesta diaria de 2 a 3 gramos de FE reduce el nivel de colesterol total y de LDL en un 10%. Además, los FE tendrían potencial para reducir la presión arterial por distintos mecanismos que involucran la reducción de la rigidez de las arterias o bien la mejora de la función endotelial (Ghaedi et al., 2020).

1.1. Colesterol

El colesterol es un lípido que juega un papel clave en muchos procesos bioquímicos y biofísicos. Es el precursor de las hormonas esteroides, de las sales biliares y de la vitamina D3, siendo además esencial para mantener la adecuada fluidez/rigidez de la membrana celular.

El metabolismo del colesterol juega un papel insustituible en la salud humana. El desequilibrio de su homeostasis es un problema público y grave en el mundo. La hipercolesterolemia es un grupo de trastornos metabólicos del colesterol caracterizados por niveles elevados del mismo (Fernández-Perez et al., 2018; Yuang et al., 2020). La arteriosclerosis y las enfermedades cardiovasculares están a menudo asociadas con los cambios en la concentración plasmática de lípidos y lipoproteínas, relacionados con el desequilibrio del metabolismo del colesterol. Este último se encuentra estrechamente relacionado con la síntesis y la absorción del colesterol, estando ambas directamente asociadas a los niveles de colesterol plasmático. En otras palabras, los niveles de colesterol plasmático circulante dependen del colesterol sintetizado por el hígado y también del colesterol absorbido en el intestino. El colesterol se deposita en las células en su forma esterificada, así como también en los quilomicrones que se forman durante la absorción intestinal de los compuestos provenientes de la dieta (Yuang et al., 2020).

El hígado es el órgano principal que regula la homeostasis del colesterol y juega un papel clave en la síntesis del mismo, en la síntesis y secreción de las lipoproteínas, en la depuración de las lipoproteínas y en la excreción del colesterol, entre otros procesos. El colesterol es secretado por el hígado en forma de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, esto es, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La regulación de la síntesis y secreción de las VLDL está muy bien coordinada, ya que son fundamentales para la distribución del colesterol. La secreción de un alto nivel de VLDL por el hígado puede eventualmente traducirse en un elevado nivel de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma y en un consecuente aumento del riesgo cardiovascular. Por el contrario, una secreción empeorada de VLDL conduce a la acumulación de lípidos en el hígado, lo cual puede ser el paso inicial de la patología conocida como hígado graso. Por lo tanto, ambos procesos deben estar perfectamente coordinados y regulados (Afonso et al., 2018; Benito-Vicente et al., 2018).

Además del colesterol sintetizado *de novo*, las células obtienen colesterol a partir de su captación de las lipoproteínas plasmáticas a través de la vía del receptor de LDL (LDLR). En plasma, los triglicéridos de las VLDL son eliminados por la acción de las enzimas lipoproteínlipasas (LPL), produciéndose restos de VLDL también conocidos como lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) (Benito-Vicente et al., 2018).

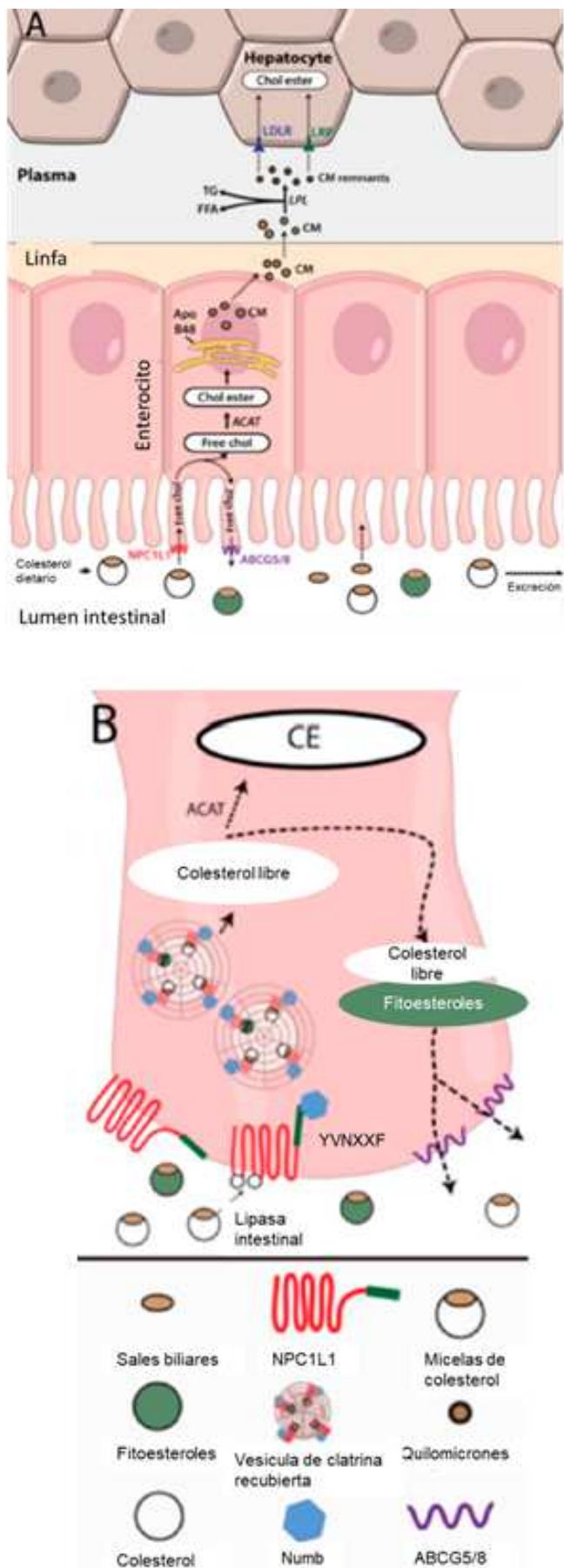
El transporte reverso del colesterol es un mecanismo estrictamente controlado por el cual el organismo puede excretar el exceso de colesterol desde los tejidos periféricos a través del hígado, alcanzando las heces. En este proceso, la proteína ApoA-1, importante componente estructural de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), constituye el principal aceptor de colesterol de los tejidos extra hepáticos y el principal responsable del *clearance* del exceso de colesterol. La ApoA-1 es un cofactor de la lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT), enzima responsable de la formación del colesterol plasmático. La excreción del colesterol en la bilis es el último paso en la eliminación del colesterol. Los

ácidos biliares son moduladores clave de la homeostasis del colesterol y los principales componentes de la bilis. Son esenciales para la emulsificación y la absorción del colesterol de la dieta en el lumen duodenal y también participan en la excreción de restos de colesterol desde el hígado a través del conducto biliar (Afonso et al., 2018; Benito-Vicente et al., 2018).

El proceso clave de la síntesis del colesterol es la conversión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), la cual es formada a partir de la acetilCoA y acetoacetil-CoA y mediada por el gen que codifica la HMG-CoA sintasa (HMGCS1). Mediar la síntesis del colesterol es una de las formas de afectar los niveles de colesterol en el intestino delgado y en el hígado (Quintana et al., 2017).

La absorción del colesterol es un proceso de varios pasos en el cual el colesterol es micelizado en la luz del duodeno por acción de los ácidos biliares, estas micelas son absorbidas por los enterocitos de las microvellosidades, el colesterol es luego ensamblado en las lipoproteínas y transportado a la linfa y la circulación (Wang & Song, 2012). El control de la absorción del colesterol en el intestino es una forma eficaz para reducir los niveles plasmáticos, proporciona múltiples blancos terapéuticos en el manejo de la hipercolesterolemia y constituye una importante estrategia para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Waite et al., 2017; Pavlović et al., 2018). La acil-CoA colesterol-éster aciltransferasa (ACAT) es un tipo de enzima que transforma el colesterol en colesterilésteres. Contiene ACAT1 y ACAT2. La transferasa ACAT1 regula la homeostasis del colesterol y se expresa ampliamente, mientras que la transferasa ACAT2 se expresa selectivamente en el intestino y en el hígado para propiciar la eficiente absorción del colesterol dietario, así como el ensamblado de las lipoproteínas (**Fig. 1**) (Wang et al., 2018). Además, la absorción intestinal del colesterol está mediada por transportadores de membrana como la proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), la cual ha sido identificada como un jugador clave en la absorción del colesterol y un transportador específico para la captación de colesterol en la superficie de la membrana plasmática celular. La proteína NPC1L1 tiene un sitio de unión del colesterol en su dominio N-terminal, el cual está expuesto al espacio extracelular, y un dominio C-terminal unido a la membrana celular. La interacción del colesterol libre con el dominio N-terminal de la NPC1L1 promueve un reordenamiento en el dominio intracelular de esta proteína, como consecuencia de lo cual se libera la región que contiene YVNXXF desde la membrana al citosol (**Fig. 1**). Una vez en el citosol, una proteína adaptadora de clatrina se une y promueve la internalización del complejo colesterol-NPC1L1-Numb por caveolas que se cierran en vesículas recubiertas de clatrina (Benito-Vicente et al., 2018).

NPC1L1-ezetimibe es un bien conocido inhibidor que ha sido ampliamente utilizado como fármaco eficaz para reducir el colesterol plasmático en el tratamiento de pacientes hipercolesterolémicos (Wang et al., 2018). Además, los heterodímeros G5 (ABCG5) y G8 (ABCG8) de transportadores dependientes de ATP (superfamilia ABC), los cuales están en directa oposición a NPC1L1, median la salida del colesterol y de los fitoesteroles (Yuang et al., 2020). Como el ezetimibe, los fitoesteroles también compiten o bloquean la absorción intestinal del colesterol (Afonso et al., 2018).



1.2. Fitoesteroles

1.2.1. Definición y conceptos generales

Así como el colesterol es el esteroide propio del organismo animal (**Fig. 2**), los fitoesteroles (FE), que comprenden los esteroles y estanoles, son los fitoesteroideos o esteroides vegetales. Como los esteroles vegetales no se sintetizan en el organismo humano deben ser por lo tanto ingeridos en la dieta. Químicamente son miembros de la familia de productos naturales "triterpenos", que incluye más de cien fitoesteroles diferentes y más de 4000 otros tipos de triterpenos (Moreau et al., 2002).

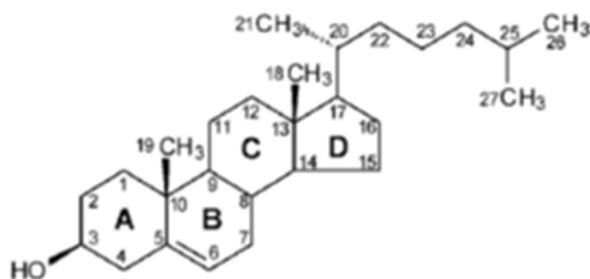


Figura 2. Estructura química del colesterol y numeración de sus átomos de carbono según IUPAC-IUB (Moreau et al., 2002).

Los FE (**Figs. 3 y 4**) difieren del colesterol solamente en la cadena carbonada lateral y/o en la ausencia o presencia de una doble ligadura C7-C8. A diferencia del colesterol (**Fig. 2**), estos incluyen un grupo metilo o etilo en C-24 (Moreau et al., 2002).

Su nomenclatura es confusa porque los intentos internacionales de estandarización han sido adoptados sólo parcialmente. Las dos nomenclaturas principales actualmente utilizadas siguen las recomendaciones IUPAC-IUB de 1976 y 1989 (**Fig. 3**) (Moreau et al., 2002). Los esteroles vegetales se pueden dividir según su función en estructurales y biosintéticos. Según el número de grupos metilo en C-4 del anillo hexacíclico, se clasifican en 4-desmetil, 4-monometil y 4,4-dimetil esteroles (**Fig. 4**) (Moreau et al., 2002). A los fines de esta tesis, sólo nos focalizaremos en el grupo de los 4-desmetil esteroles (**Fig. 4**), que es el más estudiado y al que pertenecen los FE con mayor bioactividad.

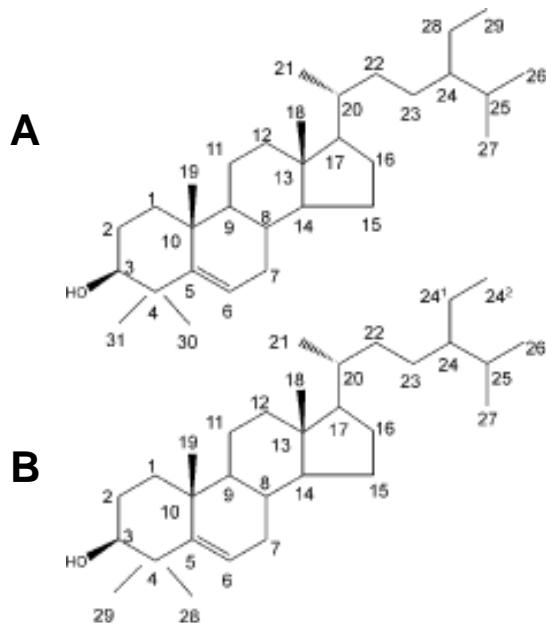


Figura 3. Nomenclatura de los fitoesteroles según IUPAC-IUB de 1976 (**A**) y 1989 (**B**) (Moreau et al., 2002).

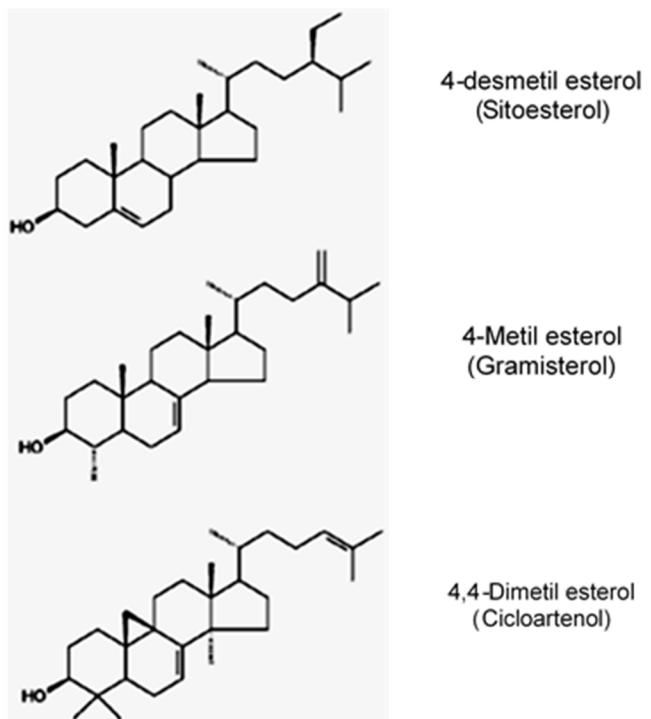


Figura 4. Estructuras moleculares de tres subclases de FE: Sitoesterol, un 4-desmetil esterol, sin grupo metilo en C-4; Gramisterol, un 4-monometil esterol; Cicloartanol, un 4,4-dimetil esterol (Moreau et al., 2002).

Los 4-metil-esteroles se producen naturalmente en pequeñas cantidades ya que son precursores de los desmetil esteroles (Moreau et al., 2002).

En la **Figura 5** se muestran las estructuras del colesterol (**A**) y de los distintos FE (Yuang et al., 2020). Como puede observarse, los FE son moléculas estructuralmente similares al colesterol pero que contienen una cadena de carbonada adicional que se une al C-24. Esta cadena carbonada es diferente para cada uno de los distintos FE, lo que le confiere características particulares a cada uno de ellos (Chen et al., 2018; Yuang et al. 2020).

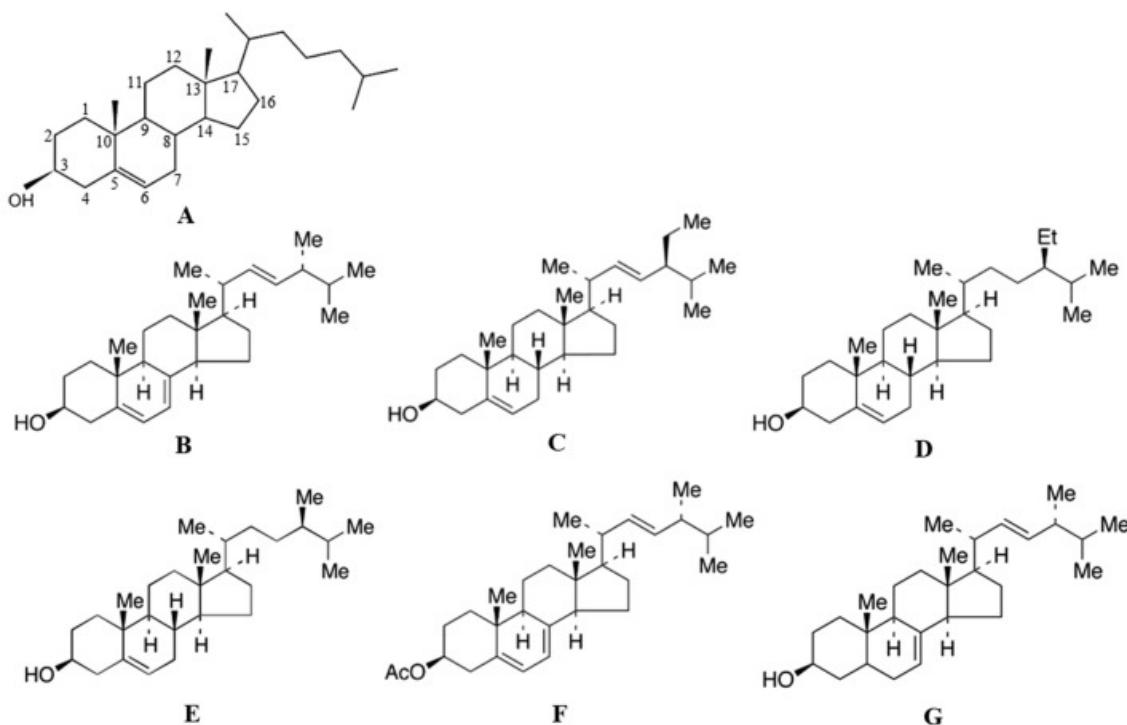


Figura 5. Estructura del colesterol y distintos fitoesteroles. (**A**) Colesterol; (**B**) Ergoesterol; (**C**) Estigmasterol; (**D**) β -Sitoesterol; (**E**) Campesterol; (**F**) Acetato Ergosterol; (**G**) Stellasterol. (Yuang et al., 2020).

Yuang et al (2020) estudiaron el comportamiento de los FE mostrados en la **Figura 5**. Ellos demostraron que todos tienen la capacidad para disminuir los niveles del colesterol en células Caco-2. Además, concluyeron que hay una correlación positiva con respecto al grupo funcional hidroxilo en C-3 y diferencias entre el ergosterol y el stellasterol (ambos difieren en el doble enlace en C-5), lo que sugiere que hay incidencia de los grupos funcionales que estén presentes en esta posición. Sin embargo, al estudiar las diferencias entre el beta-sitoesterol, campesterol y el estigmaesterol, no pudieron dilucidar si los grupos funcionales en C-22 y C-24 tenían un efecto diferente sobre la reducción de los niveles de colesterol.

1.2.2. Función biológica.

Según lo reportado por Yuang et al. (2020), los FE tienen diversidad química, complejidad estructural, actividad biológica inherente, fácil disponibilidad, asequibilidad, ausencia de efectos tóxicos y se los encuentra ampliamente difundidos en los alimentos. El β -sitosterol, el campesterol, brassicasterol y el estigmasterol son las formas más frecuentes y comunes de esteroles vegetales o

fitoesteroles libres (FEL), los cuales abundan en aceites vegetales y en frutos secos. Los FE son bien conocidos como un complemento de la terapia farmacológica por su capacidad de inhibir la absorción intestinal de colesterol tal como fuera mencionado previamente, reduciendo así los niveles del colesterol plasmático. Con el reconocimiento de la seguridad en lo que respecta al consumo de los FE, su efecto en la depleción de los niveles de colesterol plasmático da lugar a su creciente uso en el desarrollo de alimentos funcionales. La investigación sobre su mecanismo de acción también se ha convertido en un objetivo relevante en la investigación actual. Los FE tienen una estructura similar al colesterol (**Fig. 5**), existiendo por ello evidencias de que es a través de la inhibición competitiva el mecanismo por el cual los FE pueden inhibir la absorción del colesterol en la luz intestinal. Además, los FE también juegan un papel indispensable en la mediación de las proteínas arriba mencionadas NPC1L1 y ABCG5/G8, relacionadas ellas con el transporte del colesterol a través de la membrana celular de los enterocitos (**Fig. 1**). Así, como los FE pueden promover la disminución del colesterol por inhibir la absorción en el intestino, los FE se pueden utilizar como medicamentos para reducir la colesterolemia (Yuang et al., 2020).

Los FE se sintetizan a través de una vía que comienza con la formación de la HMG-CoA a partir de la acetil-CoA y la posterior reducción de la HMG-CoA (seis carbonos) a mevalonato (cinco carbonos) (**Fig. 6**). Las seis unidades de mevalonato se ensamblan en dos moléculas de difosfato de farnesilo las que, a su vez, se combinan para generar una molécula de escualeno (30 carbonos o seis unidades isoprenilo). Enzimáticamente se procede al cierre del anillo formando cicloartenol (también de 30 carbonos) (**Fig. 5**) y ocurren reacciones enzimáticas adicionales que forman triterpenos vegetales comunes como FE, alcoholes triterpénicos y brasinoesteroides (**Fig. 6**) (Moreau et al., 2002).

En las membranas de las células vegetales, los FE aumentan la relación esterol/fosfolípido, lo que conduce a la rigidización de la membrana. Sin embargo, al hablar de los FE de manera individual, difieren en su efecto sobre la estabilidad de las membranas (Moreau et al., 2002). Ellos desempeñan un rol importante durante la adaptación de las membranas a la temperatura. El grupo hidroxilo libre de los esteroles es fundamental para permitir interacciones especiales con proteínas y fosfolípidos en las membranas. Además, los esteroles participan en el control de los procesos metabólicos asociados a la membrana, lo que implica la acción de determinados esteroles específicos. Los esteroles también desempeñan un papel importante en los procesos celulares y de desarrollo en las plantas como precursores de los brassinoesteroides. También actúan como sustratos para una amplia variedad de metabolitos secundarios tales como los glicoalcaloides y las saponinas, entre otros (Moreau et al., 2002).

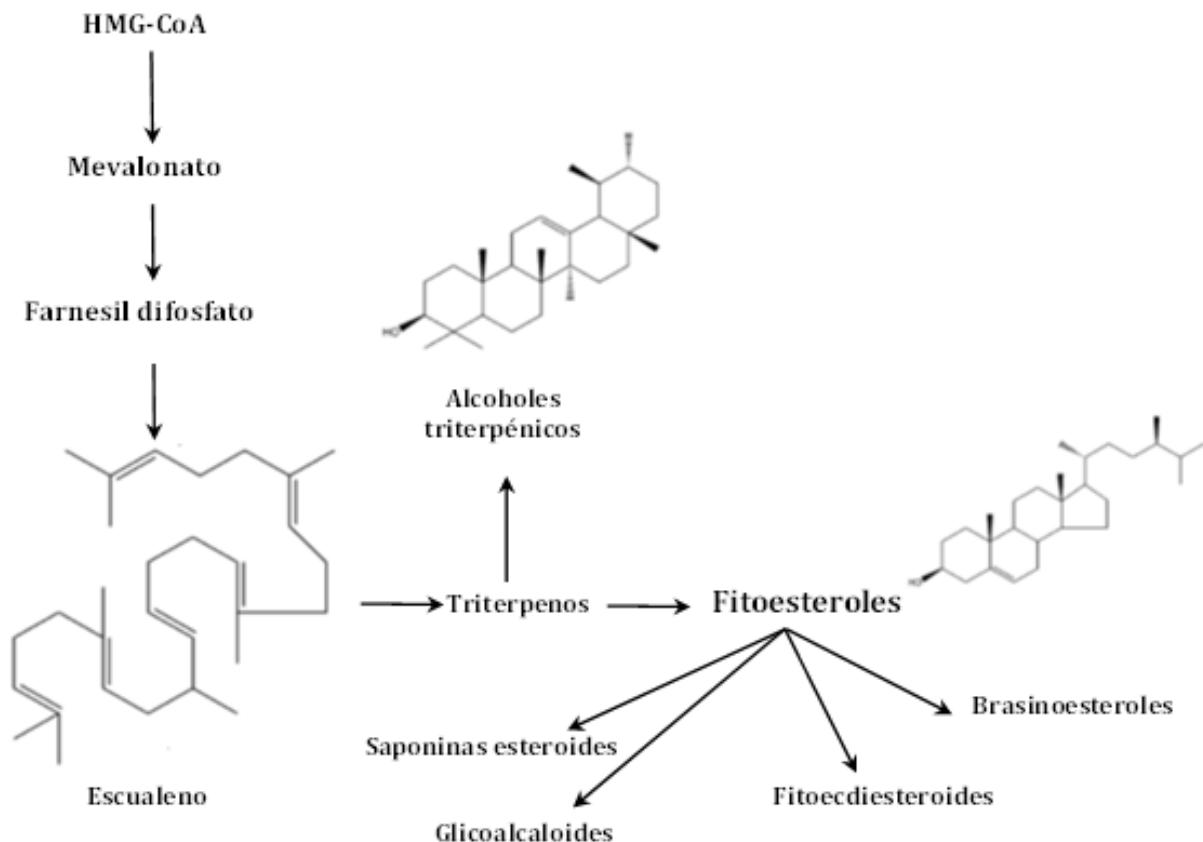


Figura 6. Biosíntesis de fitoesteroles y otros triterpenos vegetales (Moreau et al., 2002).

1.2.3. Fuentes naturales de fitoesteroles

En general, los aceites vegetales y los productos derivados de ellos son considerados fuentes naturales más ricas de esteroles vegetales, seguidos por los granos de cereales y los productos a base de cereales y nueces. Este orden es debido a que los esteroles se concentran en los aceites por el prensado de los tejidos vegetales (Moreau et al., 2002; Moreau et al., 2018). De los diversos aceites vegetales, el aceite de maíz, el aceite de colza y el aceite de germen de trigo tienen el mayor contenido de FE totales (Normén et al., 2007; Moreau et al., 2018). Sin embargo, existe un fuerte efecto varietal en el contenido de FE de algunas especies como nueces y semillas. Por ejemplo, Moreau et al. (2018) reportaron que el contenido de FE reportado en bibliografía para el aceite de colza varía entre 4.500 y 14.000 mg/kg, dependiendo no solamente del varietal, sino además de diferencias analíticas entre los estudios.

1.2.3.1. Aceites vegetales y cereales

Según estudios, la mayoría de los aceites vegetales crudos contienen 1 – 5 g/kg de FE. Las especies con mayor contenido son el maíz y los aceites de colza, del salvado de arroz y del germen de trigo, los cuales contienen alrededor de 1,29 a 15,57 g/kg de FE (desmetil, monometil y dimetil). Para

el aceite de maíz el contenido varía de 8,09 a 15,57g/kg mientras que para el aceite de colza el contenido varía entre 5,13 y 9,79 g/kg. Asimismo, para el aceite del salvado de arroz, el nivel de FE es de 1,75 – 79 g/kg mientras que en el aceite de salvado de arroz el contenido total de FE fue de 32,25 g/kg. En el trigo, para el aceite proveniente del germen se reporta un contenido de FE de 19,70 g/kg (Piironen et al., 2000; BioActive Substances in Food Information System, 2017; Moreau et al., 2002; Moreau et al., 2018)

En la **Tabla 1**, se muestra el contenido de FE de algunos aceites crudos y refinados. Vale la pena recordar que los efectos de la variabilidad genética, así como el proceso de extracción y de refinación, también influyen sobre el contenido de los FE (Moreau et al., 2002).

Las nueces y las almendras poseen un contenido de FE similar al de los aceites comestibles antes mencionados (Esche et al., 2013; Forcada et al., 2015). Esche et al. (2013) estudiaron la concentración y de qué manera se encontraban presentes los FE en los frutos secos. En el citado estudio concluyeron que, en la mayoría de los casos analizados, los FE se encontraban predominantemente de forma libre, excepto en el caso de piñones y pistachos donde se encuentran ya sea en forma libre o asociados con ésteres de ácidos grasos en la misma proporción. En cuanto a las almendras, el rango de concentración es de 1126 a 2777 mg/kg de aceite, con una media de 1883 mg/kg de aceite (Forcada et al., 2015), pero al igual que se mencionó en párrafos anteriores, existe una gran variabilidad genética y geográfica que debe ser estudiada con mayor profundidad (Moreau et al., 2018).

Con respecto a los cereales, tomando como ejemplo los valores reportados en bibliografía (Nurmi et al., 2008; Nurmi et al., 2012; Moreau et al., 2018), los mismos fluctúan de 670 mg/kg en base seca para un trigo de invierno a 949 mg/kg en base seca para un trigo de primavera, indicando que además de la variabilidad genética y geográfica, también se debe considerar la variabilidad estacional. Moreau et al. (2018) reportó valores similares para centeno (1098-1420 mg/kg), cebada (899-1153 mg/kg) y avena (618-682 mg/kg). Si bien el contenido reportado es un orden menor, este grupo de alimentos son considerados como las fuentes vegetales más abundantes de FE (Moreau et al., 2018).

Tabla 1. Contenido de fitoesteroles (FE) en aceites comestibles (g/kg).^{1,2}

Aceite	Esteroles totales	Sitoesterol	Campesterol	Estigmaesterol	Δ5-Avenasterol	Brasicaestrol
<u>Maíz</u>						
Crudo	8,09-15,5	9,89	2,59	0,98	0,36	tr
Refinado	7,5-9,52	6,9	1,58	0,76	0,22	tr
<u>Semilla de algodón</u>						
Crudo	4,31-5,39	4	0,26	tr	0,05	tr
Refinado	3,27-3,97	3,03-3,43	0,20-0,31	tr-0,04	0,04-0,09	tr
<u>Oliva</u>						
Extra virgen	1,44-1,50	1,18-1,21	0,05	0,01	0,17-0,18	-
Pulpa	2,61-2,82	2,21-2,36	0,09-0,10	0,05-0,06	0,08	0,01
<u>Palma</u>						
Crudo	0,71-1,17	0,72	0,23	0,04	0,02	tr
Refinado	0,49-0,61	0,30-0,35	0,10-0,18	0,06-0,07	tr	tr
<u>Colza</u>						
Crudo	5,13-9,79	2,84-3,58	1,56-2,48	0,02-0,04	0,13-0,19	0,55-0,73
Refinado	2,50-7,31	1,38-3,73	0,76-2,70	tr	0,06-0,23	0,27-0,54
<u>Salvado de Arroz</u>						
Crudo	32,25	17,45	6,58	2,52	3,55	-
Refinado	10,55	5,71	2,15	0,82	1,16	-
<u>Poroto de soja</u>						
Crudo	2,19-4,59	1,22-2,31	0,62-0,76	0,45-0,76	-	-
Refinado	2,21-3,28	1,23-1,73	0,47-0,82	0,47-0,52	0,01-0,02	-
<u>Girasol</u>						
Crudo	3,74-7,25	4,65	0,69	0,75	0,28	-

¹Datos tomados de Piironen et al. (2000) y Moreau et al. (2018).

²Tr: trazas.

1.2.4. Recuperación y producción de fitoesteroles y tocoferoles a nivel industrial

En el punto anterior, se detallaron brevemente cuáles eran las fuentes naturales más abundantes de FE. Industrialmente, pueden ser recuperados de los aceites vegetales durante su proceso de refinación. En el mismo, una de las tareas que se realiza es la “deodestilación” en la que se remueve parte del sabor y el olor de los aceites vegetales. Lo deseable sería que durante el proceso de refinado no se perdieran componentes con valor nutricional como los FE o los tocoferoles (TF), de los que se hablará más adelante. Sin embargo, se han reportado pérdidas del 14% de los mismos en el refinado del aceite de maíz o de palma y de entre 7% y 9% en el de colza y de soja, respectivamente, comparando aceites crudos con refinados (Maniet et al., 2019).

En la **Figura 7** se muestran las etapas básicas del proceso de refinado. Una vez obtenido el aceite por prensado y extracción con solventes, el aceite vegetal debe ser acondicionado para lograr su grado alimenticio. La etapa inicial es el desgomado en donde se eliminan compuestos insolubles

(mucílagos, fosfolípidos y metales). Luego, las ceras, las cuales tienen un alto punto de fusión, son removidas en la etapa posterior llamada winterización. Seguidamente, en el proceso de blanqueado se remueven compuestos coloreados, jabones, pesticidas y otros compuestos. Finalmente, en la etapa de desodorización, los compuestos aromáticos, flavors y olores son eliminados, pero es también en esta etapa donde los tocoferoles y los esteroles son removidos (Maniet et al., 2019).

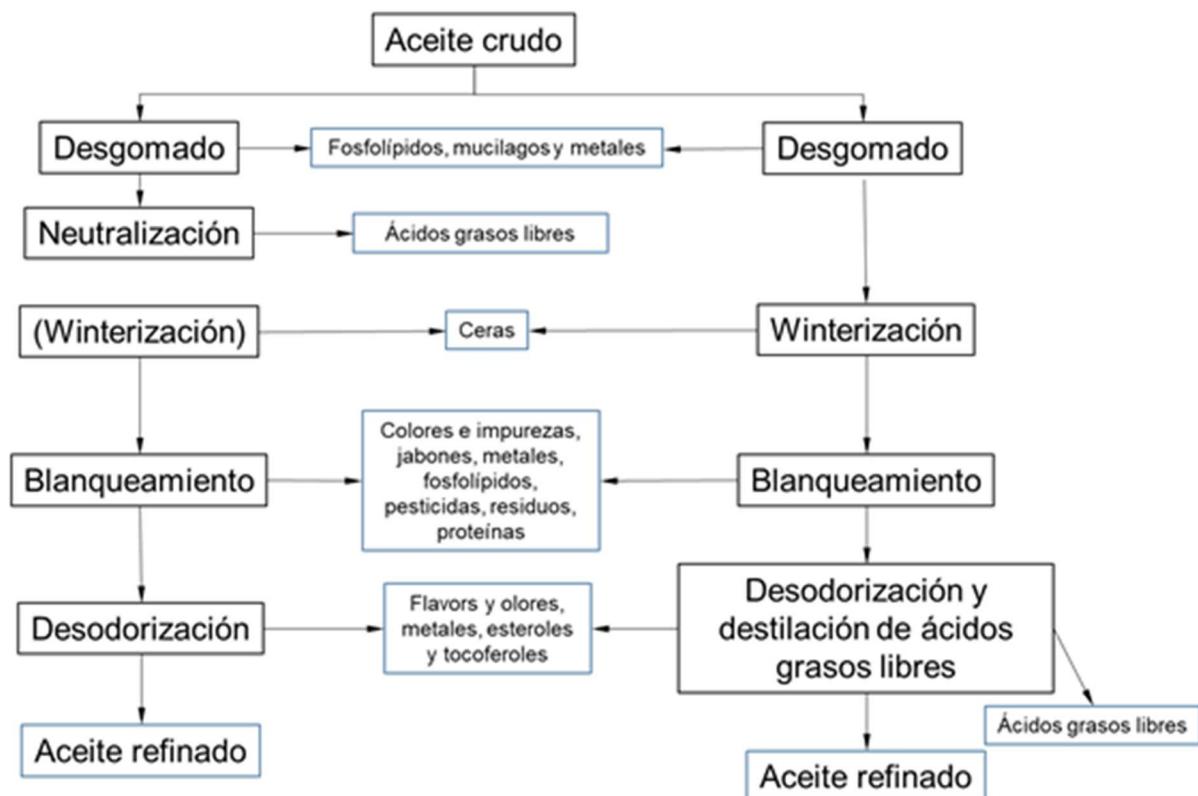


Figura 7. Proceso de refinación de aceites vegetales (Maniet et al., 2019).

Resumidamente, el desodorizado es una operación de destilación en la que se inyecta vapor en el aceite a unos 180°-220°C a una presión de 2 mbar durante aproximadamente 2 horas. La composición del deodestilado resultante (“deodestilado” acrónimo de “desodorizado destilado”) depende del origen del aceite y de las variables del proceso (Miniet et al., 2019).

Una vez obtenido el deodestilado, se deben recuperar los FE, para lo que existen dos metodologías descriptas en la bibliografía:

- Método convencional (no enzimático).
- Método enzimático.

El primero consiste en saponificar el deodestilado (saponificación es la hidrólisis alcalina de glicéridos en glicerol y sales de ácidos grasos, los que precipitan en forma de jabón). Luego se lava el líquido resultante con éter dietílico, quedando los FE disueltos en él. Finalmente, se procede a la adición de metanol lo que hace que los FE recristalicen (Brown et al., 1964; Kasim et al., 2010; Yan et al., 2012; Maniet et al., 2019).

El método enzimático consta en tratar los deodestilados con enzimas específicas. Si bien este procedimiento es más costoso que el anterior, esto se justifica en circunstancias donde se requiere un alto grado de selectividad (trans-esterificación de moléculas específicas), o bien cuando los compuestos a recuperar son termolábiles como los tocoferoles, ya que este proceso no requiere un calentamiento excesivo de la mezcla de reacción (Teixeira et al., 2011; Sujith Kumar et al., 2017; Manet et al., 2019).

1.2.5. Empresas productoras de fitoesteroles y tocoferoles a nivel mundial y en Argentina

Según un estudio publicado por la revista *Persistence Market Research* (2020), el mercado de esteroles y tocoferoles alcanzará los 1.300 millones de dólares en 2026. Algunos mercados como el de los Estados Unidos, India, China, Japón, Singapur, están experimentando un aumento en la demanda de este tipo de compuestos bioactivos, ya sea a modo de suplementos dietarios o bien de alimentos que los contengan con el fin de lograr la reducción del colesterol, teniendo además sabores únicos.

Las empresas más importantes a nivel mundial productoras de este tipo de compuestos son Advanced Organic Materials S.A., Arboris, LLC, BASF SE, Cargill Inc., COFCO Tech Bioengineering (Tianjin) Co., CoonOils LLC, Purextract, DRT Groupe, Gustav Parmentier GmbH, Nutrartis S.A., Matrix Fine Sciences Pvt. Ltd., Midland Company, Lipofoods SLU, The Archer Daniels Raiso PLC, Vitae Caps S.A., Vita-Solar Biotechnology Co. Ltd., Xi'an Healthful Biotechnology Co. Ltd., la mayoría de ellas, instaladas en países como Estados Unidos, España, Francia y China. Sin embargo, en lo que respecta a América Latina, si bien existen varios distribuidores, hay solamente dos empresas que los producen, purifican y concentran a partir del deodestilado de aceites. Ellas son Nutrartis S.A. en Chile y Advanced Organic Materials (A.O.M.) S.A. en la República Argentina.

En el año 2009, la empresa Nutrartis S.A. realizó la presentación en Chile de la solicitud de patente N° 409/2009 y en forma internacional vía PCT según registro PCT/IB2010/050414: "Proceso para obtener una dispersión de fitoesteroles en medio acuoso y dispersión obtenida". Esta solicitud permite producir a nivel industrial fitoesteroles no-esterificados de alta biodisponibilidad (<http://www.naturalis-sa.cl/>).

En tanto, en Argentina, Advanced Organic Materials (A.O.M. S.A.), desde el año 2003 produce fitoesteroles y tocoferoles a partir de subproductos (deodestilado) provenientes de la refinación de los aceites de soja y de girasol. Actualmente, tras su asociación con la empresa Glencore, además de producir FE y TF, produce biodiesel destinado a la exportación y al abastecimiento interno. Los produce a partir de diferentes materias primas y múltiples formatos que se detallaran en el siguiente párrafo (<https://aomsa.com.ar/>).

Finalmente, cabe mencionar a la empresa Saporiti S.A., la cual, si bien no produce este tipo de compuestos, distribuye una variante de fitoesteroles que se detallará más adelante.

Como es sabido, cada matriz alimentaria posee características físico-químicas particulares. Es por ello que las empresas productoras de estos compuestos ofrecen una amplia gama de presentaciones que se ajustan a las características de cada matriz. A los fines del desarrollo que abarca la presente tesis, la búsqueda se centró en dos productos / presentaciones ofrecidos por la empresa A.O.M. S.A. y en uno ofrecido por la empresa SAPORITI S.A., los cuales se detallan a continuación:

Fitoesteroles libres (FEL): Comercializado bajo la denominación Advasterol 90® y producido por la empresa A.O.M. S.A. (<https://aomsa.com.ar/>).

Fitoesteroles esterificados (FEE): Comercializado bajo la denominación Advasterol Ester® y producido por la empresa A.O.M. S.A. (<https://aomsa.com.ar/>).

Fitoesteroles emulsificados (FEEM): Comercializado bajo la denominación EMULFIT 3675 AE®, y distribuidos por la empresa Saporiti S.A. (<https://www.gruposaporiti.com/>).

En cuanto a los TF, a los fines de la presente tesis se utilizó sólo un producto de la empresa A.O.M. S.A., el alfa-tocoferol, comercializado bajo el nombre VITAMINA E NATURAL SF 900UI ®.

Estos productos, como así también las pruebas de desempeño realizadas, se detallarán más adelante en la sección “Materiales y Métodos”. Además, en la sección “Anexo” se adjuntan las hojas de especificaciones técnicas de cada uno de ellos.

1.3. Alimentos funcionales

1.3.1. Conceptos y generalidades

Como ya se mencionó anteriormente, una de las razones más importantes por las cuales los consumidores están cambiando la demanda de alimentos es su preocupación por la salud y por la ingesta de productos poco saludables. Aunque los consumidores son reacios a hacer grandes cambios en su dieta, suelen estar preparados a la incorporación de sustitutos alimenticios para alcanzar alternativas más saludables y funcionales (Faluera et al., 2012). En este sentido, las frutas y los vegetales comestibles en general proporcionan cantidades adecuadas de fibra y de fitoquímicos, reduciendo el riesgo de padecer ECNT relacionadas con las costumbres de alimentación actuales. En las sociedades modernas, la mayor parte de las frutas y de las verduras se consumen frescos o procesadas industrialmente, con una tendencia creciente hacia las bebidas listas para beber mezcladas con frutas, zumos de frutas, yogur, leche o miel (Nunes et al., 2016).

El término "alimento funcional" se utilizó por primera vez en Japón en 1984 como resultado de un estudio sobre la relación entre nutrición, satisfacción sensorial, fortificación y modulación de los sistemas fisiológicos, realizado con la finalidad de definir esos productos alimenticios que contienen compuestos especiales con efectos fisiológicos benéficos (Hardy, 2000; Kwak & Jukes, 2001). Los objetivos de los alimentos funcionales son múltiples: pueden mejorar las condiciones generales del organismo (por ejemplo, pre y probióticos), disminuir el riesgo de algunas ECNT (por ejemplo, productos

para reducir el colesterol), y podrían ser utilizados para tratar algunas enfermedades (Menrad, 2003; Mark-Herbert, 2004; Side, 2006).

Los alimentos funcionales deben ser entendidos como un grupo bien definido de productos alimenticios. Un documento de consenso publicado entre el Parlamento Europeo y la comisión sobre la Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa, *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE), ha propuesto que "un alimento puede considerarse funcional si se demuestra que afecta beneficiosamente una o más funciones objetivo en el organismo, más allá de una nutrición adecuada, de manera que sea relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o alcanzar una reducción del riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo comida, pero debe demostrar su efecto benéfico cuando se lo consume en las cantidades en las que normalmente se espera que sea consumido en la dieta: no es una píldora o una cápsula, sino parte del patrón alimentario normal" (Diplock et al., 1999).

Resumiendo, si bien los alimentos funcionales no se encuentran definidos legalmente, la literatura científica considera que estos productos aportan beneficios adicionales concretos más allá de la nutrición y de la saciedad (Bigliardi & Galati, 2013; Lenssen et al., 2018; Iwatani et al., 2019).

1.3.2. Alimentos funcionales adicionados con fitoesteroles

La mayoría de los alimentos enriquecidos con esteroles actualmente existentes en el mercado se basan en esteroles esterificados o estanoles. Los fitoesteroles libres no están regulados en muchos países y, por ello, se encuentra limitada la introducción en el mercado de alimentos enriquecidos. Ejemplos de los alimentos adicionados con FE disponibles comercialmente se enumeran en la **Tabla 2** (Salo et al., 2012).

Tabla 2. Alimentos adicionados con FE y países donde estos productos están disponibles.¹

Alimento	Ingrediente activo	País en donde está disponible
Margarinas	Fitoesteroles y fitoestanoles esterificados	Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Inglaterra, Irlanda, Finlandia, Francia, Alemania, Holanda, Japón, Portugal, Sud África, España, Suiza, Suecia, USA.
Queso tipo crema adicionado con margarina	Fitoestanoles	Bélgica, Finlandia, Holanda, Inglaterra e Irlanda.
Yogurt	Fitoestanoles	Bélgica, Finlandia, Holanda, Inglaterra e Irlanda.
Cereales listos para consumir	Fitoesteroles libres	USA (Prueba de mercado)
Snacks y barras de cereal	Fitoestanoles esterificados y fitoesteroles libres	Inglaterra, Irlanda y USA
Leche	Fitoesteroles y fitoestanoles esterificados	Argentina, Irlanda, Inglaterra, Emiratos Árabes
Bebida a base de leche-Jugo	Fitoesteroles esterificados	Argentina
Jugo de naranja	Fitoesteroles libres	USA (Prueba de mercado)
Aderezo para ensalada, aceite y mayonesa	Fitoestanoles esterificados y fitoesteroles libres	Argentina, Israel, Japón, USA
Bebidas	Fitoesteroles libres	Corea
Aderezo para ensalada en base a mayonesa	Fitoestanoles esterificados	Finlandia
Productos cárnicos (salchichas, albóndigas de pollo)	Fitoestanoles esterificados	Finlandia

¹Adaptado de Salo (2012).

Los primeros productos fueron lanzados por Raisio Group Ltd. como es el caso de la margarina 'Benecol' en Finlandia, en 1995. Unos años más tarde, en 1999, los productos de Benecol se lanzaron en los EE. UU., el Reino Unido, Bélgica, los Países Bajos e Irlanda. En 1999, Lipton Ltd. lanzó al mercado en los Estados Unidos la margarina rica en fitoesteroles "Take control" (Salo, 2012).

En la actualidad, las margarinas "Take Control", "Flora ProActive", "Becel ProActive" y "Rama Proactive" de Unilever/Lipton, o "Logicol" de Goodman Fielder Ltd. enriquecidas con ésteres de fitoesteroles se encuentran a la venta en mercados de diferentes países (Salo, 2012; Goodman Fielder, 2020; Upfield Canada Inc., 2020). Además, existen algunos productos como los que se detallan en la

Tabla 3 que poseen su contenido lipídico reducido para, de esta manera, cubrir requerimientos calóricos limitados (Salo, 2012; Raisio Group, 2020).

Tabla 3. Perfil nutricional de dos margarinas reducidas en grasa disponibles en Finlandia.¹

Parámetro nutricional	Margarina reducida en grasas “Keiju”	“Benecol light”	Diferencia
Grasa absorbible	40%	32%	-20%
Densidad calórica	360 Kcal.	300 Kcal.	-17%
SAFA ²	11 g	5 g	-55%
MUFA ²	19 g	18 g	-5%
PUFA ²	10 g	9 g	-10%
Fitoestanoles		8 g	

¹Adaptado de Salo (2012). *Cantidades en 100 gr de producto.

²SAFA ácidos grasos saturados, MUFA ácidos grasos mono insaturado, PUFA ácidos grasos poli insaturados

En la **Tabla 3** se comparan, a modo de ejemplo, las principales diferencias calóricas y de contenido de ácidos grasos de dos margarinas, una de ellas reducida en grasa (“Keiju”) y otra *light* enriquecida con FE (“Light Benecol”). La grasa absorbible y, en consecuencia, el contenido de energía, disminuyó un 20%, ya que parte de la grasa se reemplazó por estanoles no absorbibles. Además, debido a su rango de temperaturas de fusión relativamente alto (30-40°C), el estanol esterificado con ácidos grasos de aceite de canola se puede usar para hacer más untalbe el producto, lo cual repercute en el perfil de ácidos grasos del producto. El contenido de ácidos grasos saturados se reduce en un 55% mientras los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados se reducen en sólo un 5% y 10% respectivamente (**Tabla 3**).

También existen algunas “snack bars” enriquecidas con este tipo de compuestos. Bajo la marca “Benecol”, producidas por Raisio Group (2020), estos productos pueden ser encontrados en Estados Unidos, Reino Unido e Irlanda (Raisio Group, 2020).

Los alimentos lácteos, en tanto, tienen mucho potencial para ser enriquecidos con fitoesteroles. Los consumidores consideran que los productos lácteos funcionales o modificados nutricionalmente (por ejemplo, bajos en grasa) forman parte de una dieta saludable. Asimismo, el acceso a la información nutricional contribuye a la aceptación de este tipo de productos por parte de los consumidores (Bimbo et al., 2017).

El primer producto lácteo que se lanzó al mercado fue en el Reino Unido en 1999, y se trató del yogur llamado "Benecol" enriquecido con fitoesteroles esterificados (FEE). Posteriormente, en el año 2000 en Argentina se lanzó al mercado bajo la marca "SereCol ®" y ahora "Vidacol ®" (Mastellone Hnos. S.A., 2020) una línea de bebidas lácteas y de yogures también adicionados con fitoesteroles (Salo, 2012). Ambos productos aún se encuentran vigentes y disponibles para la venta (Raisio Group, 2020; Mastellone Hnos., 2020).

Como puede observarse en los párrafos anteriores, si bien existe una amplia gama de productos enriquecidos con fitoesteroles, la mayoría son productos untuosos como las margarinas. De todos modos, el segmento de los lácteos y bebidas se encuentra en plena expansión y se presenta como un nicho de mercado muy atractivo para el desarrollo de nuevos productos (Salo, 2012). Esto hace que las empresas productoras de alimentos inviertan en el desarrollo de nuevos productos funcionales o bien mejorados en sus características nutricionales (Bimbo et al., 2017).

1.3.3. Fitoesteroles y otros compuestos bioactivos liposolubles

Más allá de los efectos benéficos que han demostrado tener los fitoesteroles, vale la pena mencionar que algunos investigadores han encontrado una posible interferencia en la absorción de los carotenos en el intestino. En un estudio reciente, Gies et al. (2020) elaboraron un alimento fermentado a base de maíz y enriquecido con fitoesteroles dispersables y carotenoides, evaluando posteriormente su digestión *in vitro* y la bioaccesibilidad del colesterol y de los carotenoides en células intestinales Caco-2. Si bien concluyeron que la bioaccesibilidad del β-caroteno y del licopeno mejoró significativamente, la absorción de la β-cryptoxantina disminuyó al igual que la del colesterol. Sin embargo, ellos relacionaron estos resultados con el tamaño de la micela formada y el dispersante (maltodextrina) de los fitoesteroles. Otros metanálisis recientes también informaron la disminución de las concentraciones de carotenoides y tocoferoles, entre otros compuestos bioactivos liposolubles, en el plasma luego de ser consumidos con fitoesteroles (Baumgartner et al., 2017; Fardet et al., 2017). Aunque el mecanismo de estas interacciones se encuentra en estudio y depende de factores que van desde el estado de salud del individuo hasta, como se nombró anteriormente, el tamaño de la micela formada, estas interacciones no logran disminuir a valores peligrosos la absorción tanto de los tocoferoles como de los carotenoides, pudiéndose revertir tal efecto consumiendo al menos cinco porciones de frutas y/o verduras, lo recomendado por muchas organizaciones y trabajos científicos para mantener una dieta y un estilo de vida saludable (Noakes et al., 2002; Shilpa et al., 2020).

1.4. Leche y productos lácteos

Según el Código Alimentario Argentino (Artículo 554, Res.22 30-01-95), "con la denominación de Leche, sin calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie. La leche proveniente de otros animales deberá denominarse con el nombre de la especie productora".

1.4.1. Composición química de la leche

La leche es un producto muy complejo y su composición puede variar debido a factores como raza del animal productor, variabilidad individual dentro de la misma raza, ubicación geográfica donde se encuentra el rodeo, clima y tipo de alimentación suministrada (Baars et al., 2012; Laguna Paredes et al., 2018).

En un estudio reciente, y sólo a modo de ejemplo, Manzocchi et al. (2020) reportaron la variabilidad que presentaron el volumen producido, la composición y el tiempo de cuajada (precipitación de proteínas lácteas) de leches obtenidas a partir de rodeos alimentados con cuatro tratamientos dietarios diferentes: heno, ensilado de pasto y ensilado de maíz cortado a dos alturas diferentes, las que fueron denominadas corto y largo (**Tabla 4**). Manzocchi et al. (2020) encontraron que si bien no existen diferencias significativas en el volumen de producción de leche, se encontraron diferencias significativas en lo que respecta al contenido de grasa, lactosa y urea, al igual que en la relación grasa/proteína.

En lo que respecta a la fase lipídica de la leche bovina, más del 98% de los lípidos son triglicéridos, mientras que la fracción restante se presenta en forma de di y monoglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroles, carotenoides, vitaminas liposolubles y compuestos del flavor (Huppertz, 2017).

La composición de ácidos grasos de los lípidos de la leche es importante conocerla para determinar sus propiedades físicas, químicas y nutricionales (Huppertz, 2017). En la leche bovina, los ácidos grasos pueden sintetizarse en la glándula mamaria o bien provenir del alimento. Se han identificado aproximadamente 400 ácidos grasos en la grasa de la leche bovina. Diversos autores, entre ellos Jensen (2002), proporcionan extensas investigaciones sobre el tema.

Tabla 4. Rendimiento lechero, composición de la leche y tiempo de coagulación. Variabilidad de acuerdo al tipo de dieta suministrada al rodeo.²

Tratamiento dietario					
	Heno	Ensilado de pasto	Corto	Largo	Valor P
Rendimiento lechero (kg/día)	23,1	22,7	24,2	23,4	ns
Componentes (g/kg)					
Grasa	43,2 ^a	43,1 ^a	41,1 ^{ab}	40,4 ^b	<0,001
Proteína	37,7	37,1	37,8	37,5	ns
Caseína	28,8	28,2	28,7	28,1	ns
Caseína (g/kg proteína)	762	759	762	752	ns
Lactosa	49,7 ^a	47,2 ^b	47,8 ^{ab}	47,3 ^{ab}	<0,05
Urea (mg/dl)	14,0 ^c	28,4 ^a	17,9 ^b	16,5 ^{bc}	<0,001
Relación grasa/proteína	1,14 ^a	1,16 ^a	1,09 ^b	1,08 ^b	<0,001
Células somáticas (x1000/ml)	157	184	127	99	ns
Acidez SH	7,27	7,42	7,06	7,18	ns
Propiedades de la cuajada					
Tiempo de cuajada	11,0	10,6	10,5	10,3	ns
K ₂₀ (min)	1,52	1,50	1,41	1,50	ns
α ₃₀ (mm)	52,8	56,3	54,6	56,3	ns

² Adaptado de Manzocchi et al (2020).

Las medias que no llevan un superíndice difieren en P <0.05.

ns: no significativo.

K₂₀, velocidad de formación de la cuajada en minutos desde la adición del cuajo hasta 20 mm de amplitud en la firmeza de la cuajada; α₃₀, firmeza de la cuajada (amplitud en mm) 30 min después de la adición del cuajo.

A continuación, se describen en la **Tabla 5** los ácidos grasos más abundantes encontrados en los lípidos de la leche bovina. Coppa et al. (2019) estudiaron la variabilidad que presentaban leches provenientes de dos zonas productoras a las que denominaron tierras altas (o montaña) y tierras bajas provenientes de distintas zonas de Francia, Eslovaquia y Eslovenia. Los resultados encontrados muestran que las leches provenientes de zonas montañosas poseen mayor contenido de ácidos grasos C18:3 n-3, CLA cis-9, trans-11, MUFA y PUFA. Por el contrario, los rodeos alimentados en base a pastoreo, pero provenientes de tierras bajas, daban una leche más amarillenta lo que correlacionó con el elevado contenido de β -caroteno.

Tabla 5. Principales ácidos grasos en la leche.¹

Ácido graso	C	Insaturaciones	Rango % en la grasa total
Saturados			
Butírico	4	0	2,0-5,0
Capróico	6	0	1,0-5,0
Caprílico	8	0	1,0-3,0
Cáprico	10	0	2,0-4,0
Láurico	12	0	2,0-5,0
Mirístico	14	0	8,0-14,0
Pentadecanóico	15	0	1,0-2,0
Palmítico	16	0	22,0-35,0
Palmitoleico	16	1	1,0-3,0
Margarico	17	0	0,5-1,5
Esteárico	18	0	9,0-14,0
Insaturados			
Oleico	18	1	20,0-30,0
Linoléico	18	2	1,0-3,0
Linolénico	18	3	0,5-2,0

¹Adaptado de Jensen (2002) y Coppa et al. (2019).¹

Otro constituyente muy valioso de la leche son las proteínas. La leche bovina normalmente contiene alrededor de un 3,5% de proteínas, de las cuales el 80% está compuesto por caseínas (α_{s1} - α_{s2} - β - κ -) y el 20 % restante por proteínas del suero (Korhonen & Pihlanto, 2007). Desde el punto de vista comercial, estos compuestos juegan un rol fundamental ya que no sólo intervienen en el desarrollo de las propiedades sensoriales de la leche y de los productos lácteos derivados, sino que además aportan

péptidos bioactivos que intervienen en la calidad de la nutrición humana (Berry et al., 2020). En la **Tabla 6** se encuentran detallados las principales proteínas lácteas y su posible efecto bioactivo asociado.

Tabla 6. Concentración y propiedades bioactivas de las proteínas más relevantes en calostro y leche.¹

	Concentración en calostro (g/L)	Concentración en leche (g/L)	Efecto bioactivo asociado
Caseína (αs ₁ - αs ₂ - β- K-)	26	28	Transporte de iones, inmunomodulador, fuente de péptidos
β-Lactoglobulina	8	3,3	Antioxidante, asociación con vitamina A, fuente de péptidos
α-Lactoalbumina	3	1,2	Síntesis de lactosa y volumen de leche, inmunomodulador, asociación con calcio, fuente de péptidos
Inmunoglobulinas	20 – 150	0,5 – 1,0	Protección inmune específica, potencial fuente de bioactivos
Glicomacropéptidos	2,5	1,2	Antimicrobiano, bifidogénico, modulador gástrico, anticoagulante.
Lactoferrina	1,5	0,1	Antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, fuente de péptidos, inmunomodulador.
Lactoperoxidasa	0,02	0,03	Antimicrobiano, inmunopotenciador
Lisozima	0,0004	0,0004	Antimicrobiano, inmunopotenciador
Osteopontina		0,02	Antimicrobiano, inmunopotenciador
Albúmina del suero	1,3	0,3	Fuente de péptidos

¹Adaptado de Korhonen & Pihlanto (2007); Berry et al. (2020).

El queso puede ser elaborado con la leche obtenida de mamíferos que incluyen cabras, ovejas, búfalos, renos, camellos, llamas, cebras y el yak. La leche de los rumiantes es la mejor para la obtención de leche para elaborar quesos debido a que contiene altos niveles de caseína, requerida para proveer un coágulo adecuado. Debido a las propiedades bioactivas encontradas en las proteínas mencionadas en la **Tabla 6** es que existe un interés por parte de la industria en invertir en desarrollos de I+D para extraerlas a gran escala de manera intacta (Berry et al., 2020).

Las tecnologías utilizadas para aislar la caseína a gran escala se basan en la coagulación ácida en su punto isoeléctrico (pH 4,6) o por hidrólisis enzimática adicionando cuajo (Korhonen & Pihlanto, 2007; Berry et al., 2020).

- α -lactoalbúmina: Esta proteína se puede considerar como la proteína del suero de leche típica. Está presente en la leche de todos los mamíferos y juega un papel importante en la síntesis de lactosa en la ubre. Presenta un ión calcio fuertemente unido en su estructura, que fue descubierto por Hiraoka et al. (1980). Estudios posteriores han demostrado que el ión calcio tiene un papel clave en la estabilidad estructural y en el plegado de la proteína (Brew, 2012; Moughan, 2020)
- β -lactoglobulina: Esta proteína es la principal fuente de proteína del suero y es uno de los principales carriers ya que es responsable de la captación y transporte de moléculas hidrófobas como el colesterol, retinol, vitamina D y ácidos grasos y sus derivados. El elemento estructural central de la proteína es un plegamiento barril- β , con un sitio hidrófobo de unión al ligando (Kantopidis et al. 2004; Świątek et al., 2019).
- Lactoferrina: Es una glicoproteína de 80 kDa, producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas pero, además, puede unirse a iones de cobre, cinc y manganeso. Se encuentra en distintas secreciones de los mamíferos, pero es especialmente abundante en leche y calostro (1g/L y 7 g/L, respectivamente). Este último es el que contiene mayores concentraciones de compuestos esenciales con impacto significativo en el sistema inmune de los lactantes, exhibiendo propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales, entre otras (Moreno-Expósito et al., 2018; Iglesias-Figueroa, et al. 2018).
- Lactoperoxidasa: Es una de las principales enzimas que presenta la leche. Entre sus actividades principales se puede destacar la antimicrobiana, utilizándosela para la conservación y el estudio del historial térmico de la leche. Además, en la glándula mamaria, cumple el rol de protector biológico y antioxidante, protegiendo a las células de las especies oxígeno reactivas (Buys, 2011). Consta de una cadena polipeptídica simple de 612 residuos de aminoácidos que se ordenan un 65% bajo la estructura β , un 23% con estructura α -hélice y un 12% de manera desordenada. Su punto isoeléctrico es 9,6 y presenta un peso molecular de 78 kDa, poseyendo un grupo hemo en su sitio activo. Se encuentra ligada a calcio lo cual mantiene la integridad de la estructura (Buys, 2011; Goulding et al. 2020).

- Albúmina de suero bovino: la leche bovina contiene alrededor de 0,1-0,4 g/L de BSA (por sus siglas en inglés *bovine serum albumin*). Su presencia en leche aún está en estudio, pero se presume que es el resultado de pequeñas pérdidas de sangre en la glándula mamaria (O'Mahony & Fox, 2013; Goulding et al. 2020). Su peso es de 66 kDa y tiene 583 aminoácidos. La molécula es de forma elíptica y tiene 3 dominios. En la sangre, la BSA tiene varias funciones como, por ejemplo, unión de ligandos y atrapamiento de radicales libres, pero no tiene una función conocida en la leche, aunque se la encontró uniendo ácidos grasos y iones de metales. Si bien esta proteína puede formar puentes disulfuro con la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina e influye en las propiedades de gelificación de esta última, debido a su baja concentración no tiene influencia significativa sobre las propiedades físico-químicas de las proteínas antes mencionadas (O'Mahony & Fox, 2013; Goulding et al. 2020).

1.4.1.1. α -Lactosa

La α -lactosa o β -D-Gal-(1→4)- α -D-Glc o 4-O- β -D-galactopiranosil- α -D-glucosa es un disacárido componente de la leche, el cual se sintetiza a partir de la glucosa en la glándula mamaria. Es una de las principales fuentes de energía para el lactante y la cantidad sintetizada durante la etapa de lactancia está asociada directamente al volumen de leche que produce el mamífero (Hettinga, 2019). Como se mencionó anteriormente, la α -lactoalbúmina está involucrada en la producción de este disacárido y está regulada por la hormona prolactina, es decir que el complejo lactosa-sintetizante estará solamente activo durante la etapa del embarazo y la lactancia (Akersk, et al., 1981; Hettinga, 2019). La lactosa juega un rol importante durante la elaboración de productos lácteos, principalmente los fermentados, en donde es el principal sustrato para las bacterias que llevarán adelante la fermentación en dichos productos. Cabe destacar que existe un segmento de la población que es intolerante a la lactosa, lo que representa sin duda nuevos desafíos tecnológicos. Finalmente, la lactosa, al ser un azúcar, interviene en reacciones de Maillard, las que deben ser consideradas a la hora de desarrollar o producir lácteos en donde intervienen procesos térmicos (Hettinga, 2019).

1.4.1.2. Otros carbohidratos

Además de la lactosa, en la glándula mamaria se sintetizan otros hidratos de carbono, principalmente oligosacáridos que se producen en pequeñas cantidades con respecto a la lactosa (Hettinga, 2019). Los oligosacáridos de la leche se sintetizan a partir de la lactosa a la que se le unen, en el extremo reductor, monómeros de lactoN-biosa (Gal-(β 1,3)-GlcNAc) o unidades de lactosamina (Gal-(β 1,4)-GlcNAc). En base a estos compuestos, se puede unir una amplia gama de otras unidades de hidratos de carbono dando como resultado diferentes oligosacáridos (Urashima et al., 2007; Hettinga, 2019).

1.4.1.3. Minerales y sales

Los minerales más importantes en cuanto a su concentración son el calcio, potasio, fósforo, cloruro, sodio, magnesio y sulfatos. En concentraciones más bajas, pero no por eso menos importantes en su función, se encuentran el zinc, cobre, yodo y hierro (Baró Rodriguez et al., 2010; Kalyankar et al., 2016). En la **Tabla 7** se describe la concentración de los principales minerales presentes en la leche bovina.

La leche contiene sales inorgánicas como los fosfatos y orgánicas como los citratos, de calcio y de magnesio, las cuales se encuentran una parte en la fase coloidal de la leche, asociadas a las micelas de caseína, y otra en disolución. A esto se lo conoce como “equilibrio iónico de la leche” y es de suma importancia para mantener la estabilidad de la misma, la que se ve afectada por etapas del proceso al que se somete la leche cruda para la obtención de la leche fluida para consumo y de los productos lácteos. Entre estas etapas del proceso se pueden mencionar la pasteurización (tratamiento térmico), las de elaboración de quesos (coagulación, concentración, fermentación), el secado (tratamiento térmico) y la congelación (procesamiento en frío) (Burrow et al., 2019).

Tabla 7. Contenido de minerales en la leche bovina (mg/100mL)¹.

Mineral	Concentración (mg/100mL)
Ca	122
P	119
Mg	12
K	152
Na	58
Cl	100
S	1,12
Fe	0,08
Cu	0,06
Mn	0,02
Zn	0,53
I	0,021
Se	0,096

¹ Adaptado de Kalyankar et al. (2016).

1.4.1.4. Vitaminas

Las vitaminas son compuestos bioactivos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos que se encuentran en la leche (Fox, 2003; Baró Rodriguez et al., 2010; Kalyankar et al., 2016). El contenido de vitaminas de la leche es muy variable dependiendo principalmente de la especie y dieta que consuma el rodeo. Rossetti et al. (2015) estudiaron la modificación de la capacidad antioxidante de la

leche a través de la dieta suministrada a los animales y su variabilidad en dos épocas del año, otoño-invierno y primavera-verano. Concluyeron que, luego de 20 días de suministrar un nivel de 50% de pastura, la composición se modificaba favorablemente, lográndose una leche con mayor capacidad antioxidante debido al perfil de vitaminas antioxidantes. Además, observaron que la variable estacional también influye en la incorporación de los compuestos. Otro resultado que obtuvieron fue que la mejora en el perfil se transfería a la leche en polvo y a los quesos duros producidos a partir de estas leches y que, al realizar el seguimiento de la vida útil de la leche en polvo, el aumento de las vitaminas antioxidantes liposolubles sirvió para preservarla de los efectos de la oxidación (Rossetti, 2015).

En la **Tabla 8** se describe brevemente el rango de concentraciones de las principales vitaminas encontradas en la leche.

Tabla 8. Concentración de vitaminas (mg/100 mL) en leche bovina.¹

Parámetro	Concentración (mg/100mL)
Vitaminas hidrosolubles	
Tiamina (B1)	28-90
Riboflavina (B2)	116-202
Niacina (B3)	50-120
Ácido pantoténico (B5)	260-490
Piridoxina (B6)	30-70
Biotina (B7)	2-4
Ácido fólico (B9)	1-18
Cobalamina (B12)	0,27-0,7
Ácido ascórbico (C)	300-2300
Vitaminas liposolubles	
Vitamina A	17-50
Colecalciferol (D3)	0,3
α tocoferol (E)	20-184
Filoquinona (K)	1,1-3,2

¹ Adaptado de Claeys et al. (2014) y de Kalyankar et al. (2016).

Al igual que se mencionó en el caso de los minerales y las sales, los procesos térmicos a los que es sometida la leche afectan los valores de estas vitaminas, ya que muchas de ellas son termolábiles (Kalyankar et al., 2016).

1.5. Oxidación y antioxidantes

Los radicales libres y los antioxidantes se encuentran entre sí en equilibrio. Los radicales libres son compuestos reactivos que tienden a capturar electrones de moléculas biológicas para estabilizarse. El proceso de oxidación tiene tres pasos bien definidos: el primero, iniciación, en donde se forman los radicales, el segundo, la propagación, donde reaccionan con otras moléculas y, finalmente, en el tercer paso, la terminación, cuando se transforma en productos estables (Fig. 8) (Pokorný et al., 2001; Carocho et al., 2018).

Existen tres especies radicalarias principales, esto es, las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las especies reactivas de azufre (RSS). El estrés oxidativo da paso a la producción de especies y radicales altamente reactivos, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($OH^{\bullet-}$), radical óxido nitroso (NO^{\bullet}), radical alquiloxy (RO^{\bullet}) y otras especies como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno atómico (O^{\bullet}), que se pueden producir tanto exógena como endógenamente (Carocho et al., 2018).

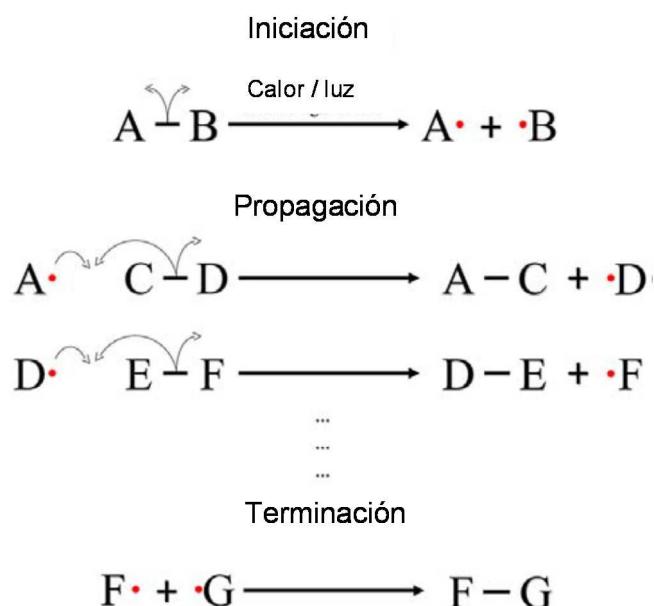


Figura 8. Pasos del proceso de oxidación. Tomado de Carocho et al. (2018).

Estas especies y radicales se generan de muchas maneras y, como puede observarse en la Figura 9, pueden afectar lípidos, ADN y proteínas, volviéndolos inestables. Si no se neutralizan a tiempo, los radicales libres desencadenan procesos inflamatorios, agudos o crónicos, que conducen a enfermedades como por ejemplo el Alzheimer, Parkinson, accidente cerebrovascular, diabetes y esclerosis múltiple, entre otras. Para contrarrestar los ataques que producen estas especies, el organismo cuenta con un conjunto de antioxidantes endógenos que actúan como la primera línea de defensa (enzimas y otras moléculas). Pero muchas veces no es suficiente y, por lo tanto, el cuerpo humano debe incorporar antioxidantes exógenos provenientes de distintas fuentes alimentarias (frutas, verduras, lácteos y carne) (Carocho et al., 2018).

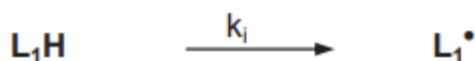


Figura 9. Causas, objetivos, órganos afectados y antioxidantes involucrados en el estrés oxidativo.
Adaptado de Carocho et al. (2018).

1.5.1. Oxidación lipídica

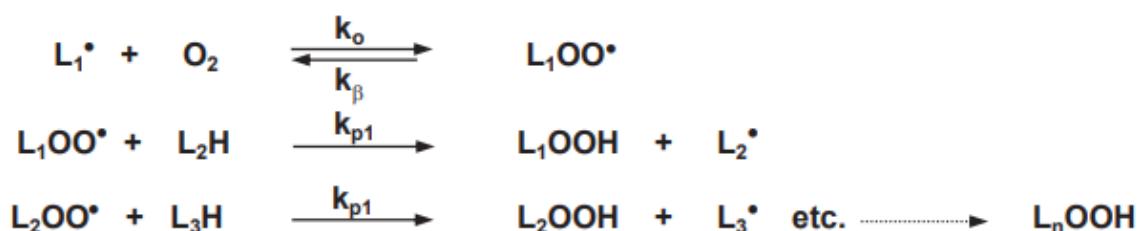
En la **Figura 8** se describió brevemente de qué consta cada una de las tres etapas del proceso de oxidación y se habló además de las tres especies radicalarias más importantes. La oxidación de lípidos puede verse como una reacción en cadena de radicales libres impulsada por sustracciones de hidrógeno. Los hidroperóxidos resultantes son productos estables, pero los radicales de descomposición son los precursores de todos los productos que se forman al final de las cadenas de oxidación (Schaich, 2016), tal como se describe en la **Figura 10**.

Iniciación

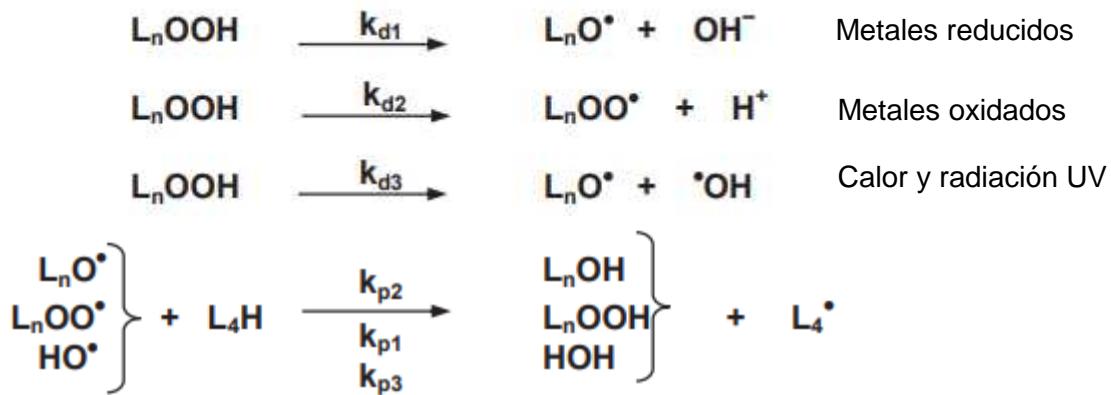


Propagación:

Reacción de la cadena de radicales



Iniciación de nuevas cadenas (ramificación)



Terminación (Formación de productos no radicalarios)

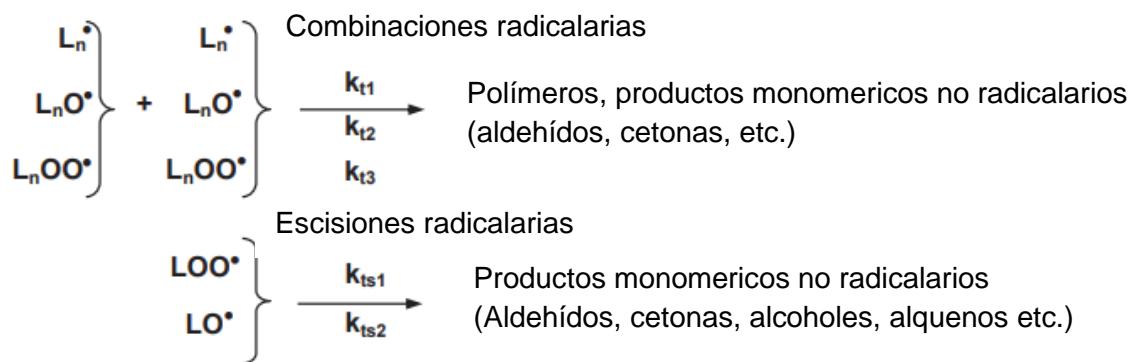


Figura 10. Mecanismo de oxidación lipídica. Reacción clásica de la cadena de radicales libres. i: Iniciación; o: Oxigenación; β : O_2 escisión; p: propagación; d: disociación; t: terminación; ts: terminación/escisión. Adaptado de Schaich (2016).

Las reacciones de oxidación lipídica son relativamente lentas, haciendo necesario que el seguimiento de los productos de oxidación y/o el seguimiento de la vida útil de un determinado alimento se prolongue por semanas o meses (Schaich, 2016). Sin embargo, existe evidencia científica que demuestra que al mismo tiempo que ocurren las reacciones de captura de hidrógeno por radicales peroxilo y alcoxilo, ocurren reacciones alternativas que se combinan desarrollando un sistema de reacción integrado mucho más complejo, el cual se describe la **Figura 11**.

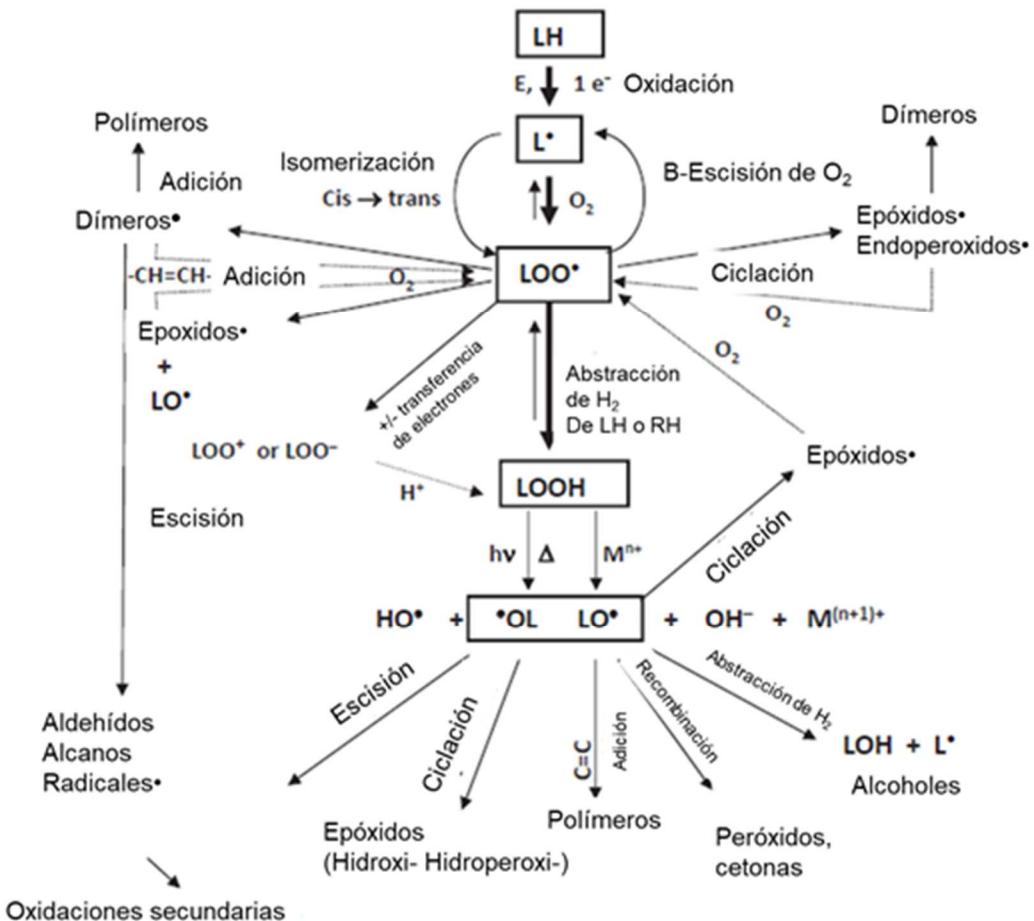


Figura 11. Esquema de la peroxidación lipídica con reacciones alternativas. Adaptado de Schaich (2016).

En la **Figura 12** se esquematiza cómo la oxidación lipídica interviene en la oxidación proteica.

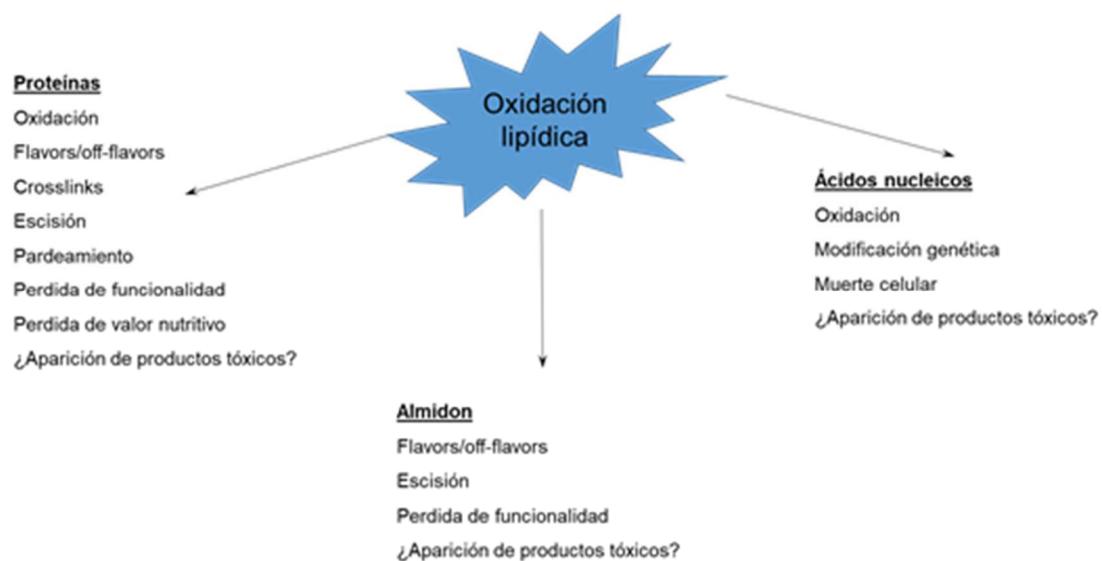


Figura 12. Daño celular a partir de la co-oxidación lipídica. Adaptado de Schaich (2008).

Las reacciones de los radicales lipídicos peroxilo (LOO^\bullet) generan, desde su inicio, compuestos (dímeros, epóxidos y aldehídos) que pueden desviar los radicales de la formación de hidroperóxidos hacia otros caminos. Xie et al. (2015) demostró que no sólo los epóxidos se formaban antes que los hidroperóxidos sino que, además, la concentración era mucho mayor. También los radicales lipídicos alcoxilo, LO^\bullet , pueden sufrir reordenamientos internos, escisiones y adiciones que hace que los aldehídos resultantes (**Fig. 13**) no siempre se formen. Es por esta razón que se debe prestar especial atención en la elección de el/los métodos utilizados para medir productos de oxidación ya que por ejemplo medir hexanal o decadienal solamente puede hacer que no se contemplen otros compuestos (Xie et al., 2015; Schaich, 2016).

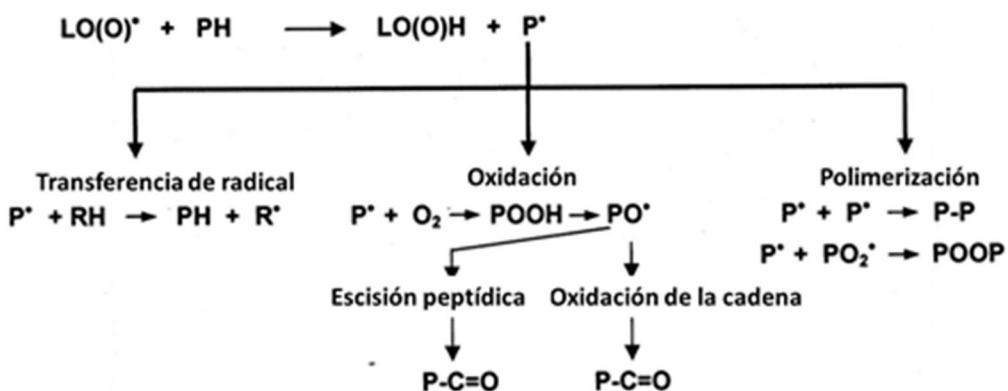


Figura 13. Vías y consecuencias de la producción de radicales libres en proteínas. Adaptado de Schaich (2008). Referencias: P^\bullet es un radical proteico en cualquier carbono alfa de la estructura principal del péptido o en una cadena lateral de aminoácidos. RH es cualquier molécula con hidrógenos expuestos.

En sistemas complejos como los alimentos, la situación se agrava ya que los radicales resultantes de la oxidación lipídica reaccionan con otros compuestos del alimento, principalmente proteínas (**Fig. 13**). Se determinó que la oxidación de lípidos y proteínas en matrices complejas como el queso es un proceso complejo. La oxidación de proteínas se correlacionó con el contenido de grasa de los quesos y la interacción entre los radicales lipídicos y las proteínas pareció influir en la generación de ditirosina. La cantidad de productos resultantes de la oxidación de proteínas (ditirosina y dimetil disulfuro) y de los lípidos (hidroperóxidos de lípidos, pentanal, hexanal y heptanal) se redujo significativamente en los quesos envasados al vacío. Por otro lado, se determinó que el agregado de antioxidantes tales como el ácido ascórbico y el hidrolizado de proteínas del suero lácteo al suero pasteurizado utilizado en la producción de quesos mozzarella y cheddar dio como resultado un menor sabor a cartón y concentraciones más bajas de pentanal, heptanal y nonanal en comparación con el suero pasteurizado control (Liaw et al., 2010). Es por esta razón que se deben estudiar y contemplar todas las reacciones de degradación oxidativa para evitar el deterioro oxidativo en sistemas tan complejos como son los alimentos (Schaich, 2008; Schaich 2016).

1.5.2. Oxidación proteica

La oxidación de proteínas se encuentra íntimamente relacionada con la oxidación lipídica ya que a menudo ambos tipos de moléculas se encuentran asociadas en las diversas moléculas alimentarias y porque los productos intermediarios de la oxidación lipídica pueden reaccionar con las proteínas (**Fig. 13**) (Schaich, 2008). Cuando una proteína se oxida cambia su configuración y, por ello, su comportamiento general. Es porque se afecta el entrecruzamiento, se puede producir escisión, resultando todo ello en la alteración de la textura y en la pérdida de valor nutricional. Además, se puede ver afectada la funcionalidad molecular (actividad enzimática, oscurecimiento y pérdida del color en los alimentos) y si se analiza un sistema *in vivo* se pueden ver alteraciones en la señalización celular, en la respuesta genética o bien en la apoptosis (Schaich, 2008).

Las reacciones de los lípidos oxidados y de sus compuestos de degradación con las proteínas son importantes para la ciencia de los alimentos, la química, la bioquímica y la medicina. A continuación, se hará una breve reseña de cómo las especies oxidantes lipídicas más comunes tales como radicales libres hidroperóxidos, epóxidos y productos carbonilo secundarios (principalmente aldehído) afectan a las proteínas (Schaich, 2008; Estévez, 2019).

Como se mencionó anteriormente, los lípidos oxidantes generan múltiples especies reactivas, las que tienen potencial para reaccionar con moléculas no lipídicas:

- Los radicales peroxilo y alcoxilo transfieren radicales a otras moléculas, lo que lleva a entrecruzamientos y polimerización, así como a escisiones moleculares entre otros.
- Los hidroperóxidos se unen a proteínas y a ácidos nucleicos, lo que lleva a la descomposición *in situ* y a la subsiguiente sustracción de H de las proteínas.
- Los epóxidos se unen a las proteínas formando aductos.
- Los aldehídos participan en una variedad de reacciones de adición que conducen a la formación de aductos y de entrecruzamientos con otras moléculas.

En relación con los radicales peroxilo y alcoxilo, independientemente del lugar o mecanismo, la transferencia de radicales lipídicos LOO^\bullet y LO^\bullet a proteínas, por abstracción de H, genera radicales proteicos (P^\bullet) (**Fig. 13**). Dependiendo de que la proteína sufra el ataque, se alterará su conformación afectándose la solubilidad, inhibiéndose la actividad enzimática. Además, se verá afectada su capacidad de recombinarse y de formar polímeros, su capacidad de añadir oxígeno para formar el radical peroxilo y/o su capacidad de experimentar reacciones de escisión con descarboxilación; en algunas condiciones también muestran desaminación en patrones similares a las proteínas irradiadas (Schaich, 2008; Soladoye et al., 2015; Ferreira et al., 2018).

A diferencia de los radicales lipídicos, epóxidos y productos de oxidación con carbonilo, los hidroperóxidos lipídicos no son especies reactivas *per se* pero, sin embargo, las proteínas expuestas a estas especies se dañan en minutos, induciendo la descomposición de las especies LOOH y una

reacción directa del $LO(O)^\bullet$ resultante con determinados aminoácidos (Schaich, 2008; Soladoye et al., 2015). Estas reacciones pueden o no estar mediadas por iones de metales y verse potenciadas por proteínas unidas a lípidos, como la albúmina de suero bovino, donde las cadenas laterales hidrofóbicas facilitan las asociaciones con los lípidos y aportan residuos que pueden reaccionar con la especie $LOOH$. En la **Figura 14** se describe el mecanismo de reacción entre los hidroperóxidos lipídicos y las aminas y sulfhidrilos de las proteínas (Schaich, 2008).

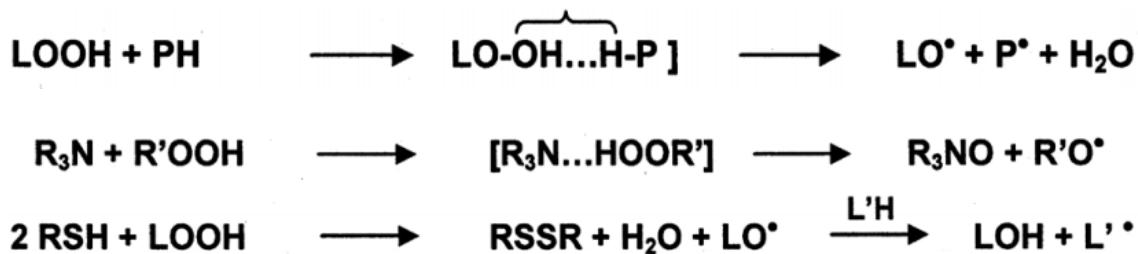


Figura 14. Mecanismo de reacción entre los hidroperóxidos lipídicos y las aminas y sulfhidrilos de las proteínas.

Los epóxidos lipídicos son compuestos cancerígenos, mutagénicos y fuertemente citotóxicos. Como se observa en la **Figura 15**, son productos cíclicos generados por reacciones internas de hidroperóxidos lipídicos, productos de adición de peroxilo o radicales alcoxilo, o reacción entre hidroxinonenal e hidroperóxidos lipídicos o peróxido de hidrógeno (Schaich, 2008; Soladoye et al., 2015; Schaich, 2016).

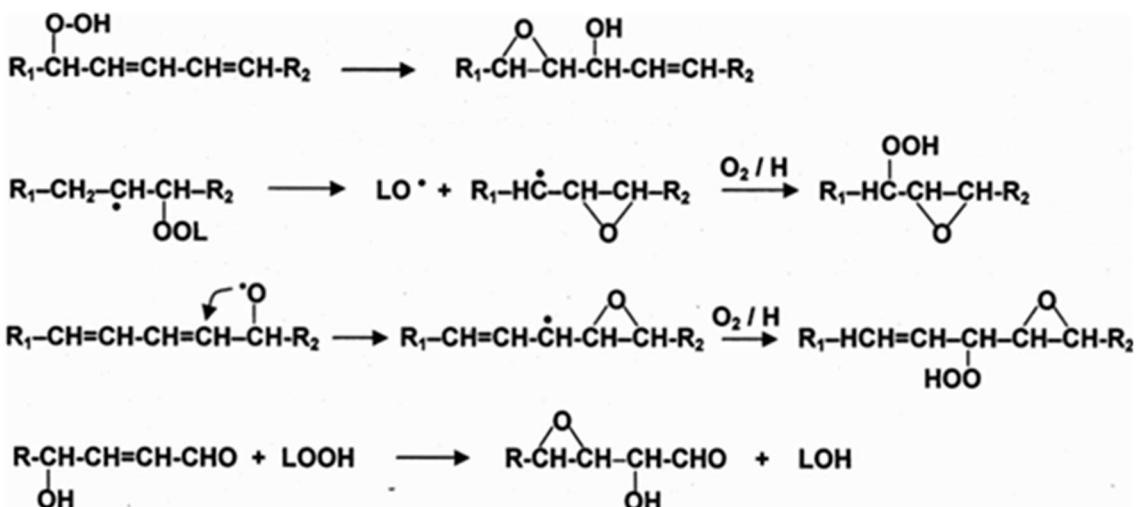


Figura 15. Reacciones de epóxidos lipídicos. Adaptado de Schaich (2008) y Schaich (2016).

Al ser compuestos altamente reactivos e inestables, las ciclaciones internas o reordenamientos de LO^\bullet a epóxidos son muy comunes, compitiendo con la captura de H durante la oxidación de lípidos. La ciclación se ve favorecida cuando la concentración de lípidos es baja (por lo tanto, hay baja concentración de protones vulnerables), cuando se está en presencia de disolventes apróticos, cuando

existen lípidos insaturados y a bajas temperaturas. Por lo tanto, los epóxidos son componentes comunes de la mayoría de los sistemas de reacción complejos (Schaich, 2016).

Finalmente, los aldehídos (productos secundarios) son responsables de olores desagradables y de sabores asociados con la rancidez, por lo que han recibido una atención considerable en los estudios de co-oxidación. Todos los aldehídos reaccionan con grupos nucleofílicos de las proteínas formando aductos, dando como resultado:

- La formación de aductos lineales (base de Schiff, adición de Michael o una combinación de ambos) lo que hace que la superficie de las proteínas se modifique, modificando el reconocimiento de las proteínas. Este es el paso inicial para todos los aldehídos.
- La formación de productos cíclicos, especialmente dihidropiridinas y pirroles, como aductos o en enlaces cruzados.
- La formación de enlaces con otras proteínas, con otras moléculas o con la misma proteína. Estas combinaciones se forman a través de reacciones con bases de Schiff, combinaciones de reacciones de formación de bases de Schiff y de adición de Michael, así como combinaciones complejas de cualquiera de éstas.

Las reacciones que ocurren para formar estos complejos se ven influenciadas por la naturaleza de la proteína, la relación proteína-aldehído, el pH, la fase o disolvente y la tensión de oxígeno entre otros factores (Schaich, 2008; Schaich, 2016).

1.5.3. Antioxidantes alimentarios: legislación

Los aditivos alimentarios son moléculas que se introducen en los alimentos para cumplir funciones tecnológicas específicas. Ellas involucran la preservación de los alimentos, impactando directamente en la vida útil, o bien el resaltar o impartir color, sabor o textura entre otras funcionalidades (Carocho et al., 2017; Carocho et al., 2018). Los aditivos son agregados durante la producción del alimento y deben estar estrictamente controlados y legislados por los organismos competentes como la EFSA (*European Food Safety Authority*) en la Unión Europea (UE), la FDA (*Food and Drug Administration*) en los Estados Unidos. Otros organismos involucrados en la legislación de estos compuestos son la JECFA, la Organización Conjunta para la Agricultura y la Alimentación (FAO) / Comité de Expertos en Alimentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Codex Alimentarius (Carocho et al., 2018). En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA) en su capítulo 18 regula este tipo de compuestos.

Uno de los grupos de aditivos más importantes son los conservantes, los que a su vez se subdividen en tres grupos más pequeños, a saber, los antimicrobianos, los antioxidantes y los agentes anti-pardeo (Carocho et al., 2017; Carocho et al., 2018). El subgrupo de aditivos antioxidantes tiene como objetivo extender la vida útil de los productos alimenticios por protegerlos de la rancidez, la pérdida o cambios del color, el desarrollo de *off-favor*, modificación de la textura, entre otros.

1.5.4. Tocoferoles como antioxidantes. La vitamina E

Los tocoferoles y los tocotrienoles son derivados del 6-cromanol. Los primeros, poseen una cadena lateral con 16 carbonos de isoprenoides saturados y tres centros quirales con la configuración R en las posiciones 2, 4 y 8, tal como se indica en la **Figura 16 A** (Stocker, 2004; Azzi, 2019). De esta manera, y en base a los tres centros quirales, podremos encontrar tocoferoles o tocotrienoles con configuraciones RRR, RRS, RSR, RSS, SSS, SSR, SRS y SRR (Stocker, 2004; Azzi, 2019). Por otro lado, la denominación de vitamina E, incluye ocho isoformas liposolubles: α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol (Azzi, 2019).

La utilización de los tocoferoles como antioxidantes engloba tres de las cuatro isoformas, α -, β - y γ -tocoferol, siendo el δ -tocoferol la única isoforma que no está permitida como aditivo (Carocho et al., 2018). En términos de actividad antioxidante, en tanto, el α -tocoferol es la isoforma más activa y, dentro de esta configuración, sólo las formas RRR y RRS (provenientes de mecanismos de síntesis natural), seguidas de las β -, γ - y δ - del tocoferol (Stocker et al., 2004; Azzi, 2019). La mayoría de las investigaciones realizadas sobre la vitamina E se centraron principalmente en el isómero α - ya que es predominante en los tejidos humanos y una ingesta deficiente de este isómero, resulta en la ataxia asociada a la deficiencia de vitamina E (Jiang, 2014).

Las diferencias entre las formas α , β , γ y δ están en el número y la posición del grupo metilo en el anillo (**Fig. 16**). Sólo las formas β - y γ - de los tocoferoles y/o tocotrienoles pueden ser llamados isómeros, ya que tienen la misma fórmula, pero diferente disposición de los átomos en la molécula. La diferencia entre los tocoferoles y los tocotrienoles está en que estos últimos presentan tres dobles enlaces en la cadena (**Fig. 16B**) (Azzi, 2019). En el hígado, el isómero α - se une preferentemente a la proteína transportadora de α -tocoferol (α -TTP). Esta proteína junto a otro transportador específico, incorporan el α -tocoferol a las lipoproteínas, transportándola de esta manera a distintos tejidos a través de la circulación. La afinidad de la proteína transportadora α -TTP por el α -tocoferol es del 100%, mientras que la afinidad para las formas β , γ y δ resulta menor (50, 10-30, o 1% respectivamente) (Jiang, 2014).

La EFSA los aprueba y los rotula para ser utilizados como antioxidantes alimentarios bajo el número E-306 al E-309 (Carocho et al., 2018), mientras que en el CAA se los puede encontrar rotulados bajo los códigos INS 306 e INS 307. Se utilizan principalmente como aditivos en productos con alta cantidad de grasa en su composición como por ejemplo aceites y productos cárnicos (Carocho et al., 2018).

En la nueva regulación para el etiquetado de información nutricional, la FDA está reemplazando la unidad "UI" de las vitaminas A, D y E por la unidad métrica. De esta manera, para el caso de la vitamina E, la unidad de la misma se cambiará a "miligramos" de α -tocoferol (mg). En la nueva unidad, 1 mg de α -tocopherol equivale a 1 mg de RRR- α -tocopherol y a 2 mg *all-rac*- α -tocopherol. Esta regulación entró en vigencia el 1 de enero de 2020 para empresas con ventas anuales de US \$ 10 millones o más y a partir del 1 de enero de 2021 para empresas con menos de US \$ 10 millones en ventas anuales (FDA, 2019).

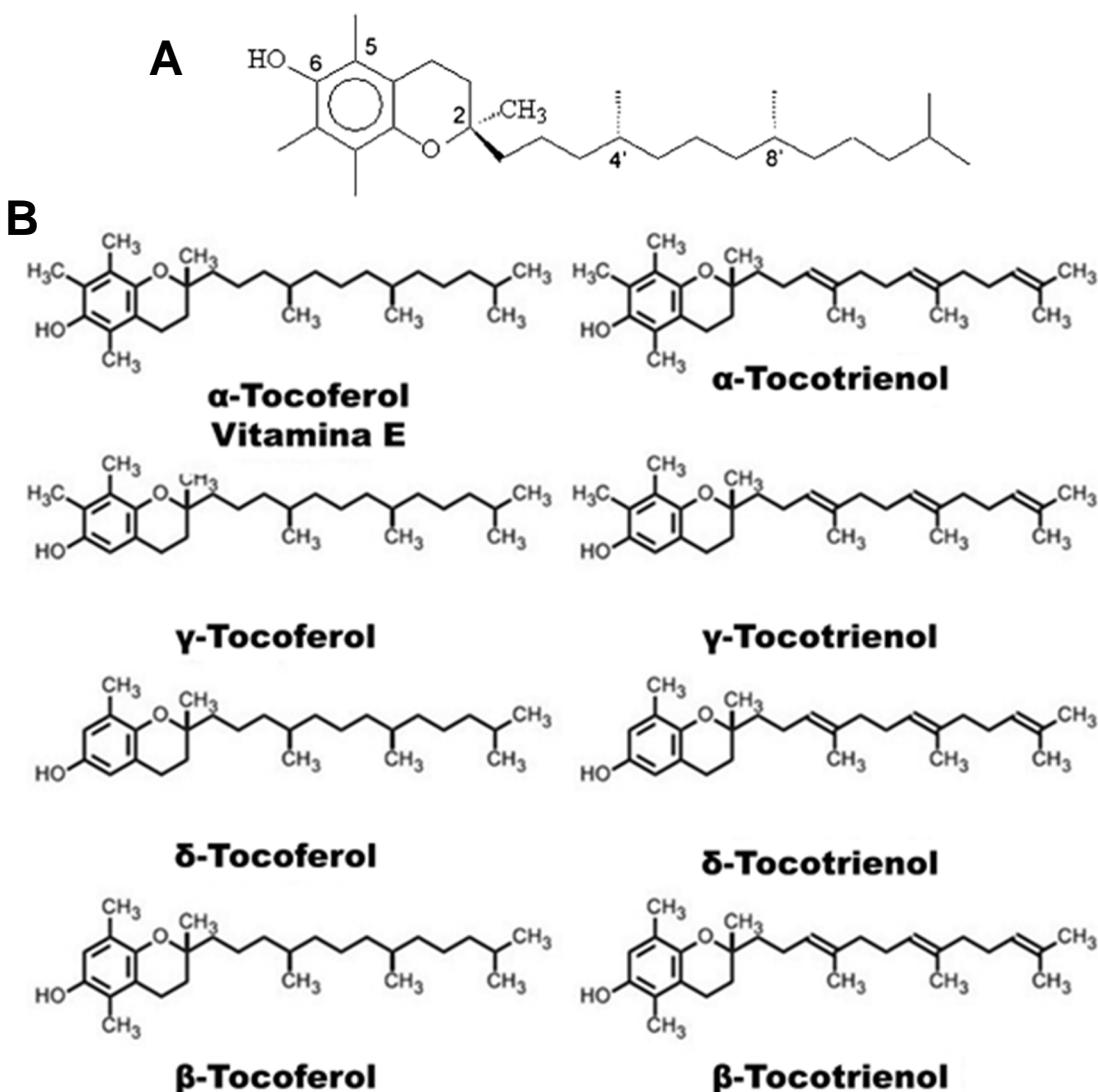


Figura 16. Estructura del RRR-α-Tocoferol. Adaptado de Socker (2004) (A). Estructura de tocoferoles y tocotrienoles. Adaptado de Azzi (2019) (B).

En la **Figura 17** se observan las reacciones oxidativas en ausencia y en presencia de vitamina E. Cuando hay presencia de radicales peroxilo (ROO^\bullet), éstos reaccionan 1000 veces más rápido con la vitamina E (Vit E-OH) que con los ácidos grasos PUFA (RH); el grupo hidroxilo de la vitamina E reacciona con el radical peroxilo para formar el hidroperóxido (ROOH) y el radical libre tocoferilo o de la vitamina E (Vit E-O $^\bullet$). Es de esta manera como las membranas y las lipoproteínas están protegidas por la vitamina E de la reacción en cadena de peroxidación lipídica (Traber et al., 2020).

Además, está documentado en bibliografía (Azzi, 2019; Traber et al., 2020) que existe un efecto sinérgico cuando la vitamina C (ácido L-(+)-ascórbico) está presente junto con la vitamina E frente a un

ataque oxidativo (**Fig. 17**). Cuando el radical tocoferilo (Vit E-O[•]) está formado, reacciona con la vitamina C oxidándola y transformándola en radicales libres ascorbato (Asc^{•-}), devolviendo al radical tocoferilo (Vit E-O[•]) a su estado reducido (Vit E-OH). Cabe señalar que los iones metálicos libres, como los del hierro o cobre, pueden reiniciar la peroxidación lipídica por reacción con ROOH para formar un radical alcoxilo (RO[•]).

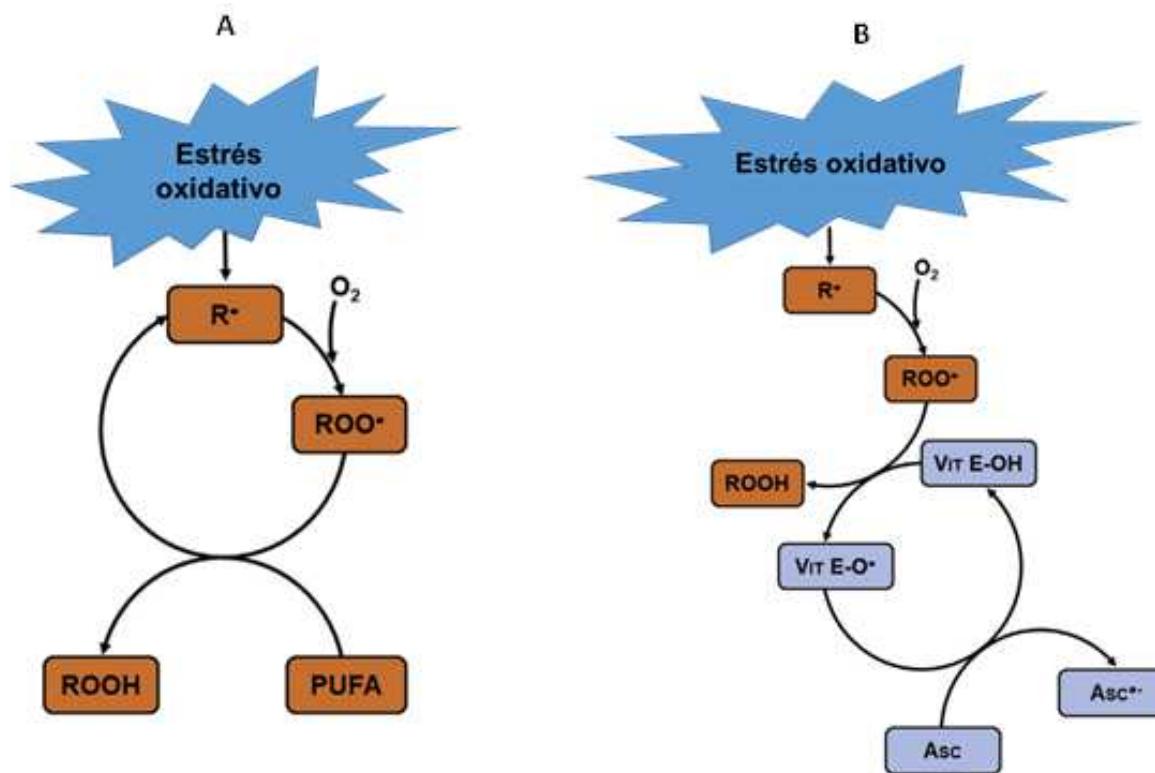


Figura 17. Reacciones de oxidación lipídica en ausencia de vitamina E (A), donde la peroxidación continua y se propaga, y en presencia de vitamina E y vitamina C, donde la peroxidación lipídica se termina (B). Adaptado de Azzi (2019).

1.5.5. Beta-caroteno (provitamina A) y retinol (vitamina A)

La vitamina A es un nutriente esencial liposoluble de la dieta que modula la respuesta inmune y mantiene la homeostasis de los tejidos epiteliales y mucosas a través de su metabolito, el ácido retinoico (Roche & Harris-Tryon, 2021). En la nueva regulación de la FDA para el etiquetado de información nutricional, la unidad de vitamina A se cambió, a partir del 1 de enero de 2020, de "UI" a "microgramos" (mcg) de equivalentes de actividad de retinol (mcg RAE) (FDA, 2019). Los humanos y otros mamíferos sintetizan retinol a partir de los carotenoides presentes en plantas y microorganismos. El carotenóide principal es el β -caroteno (**Fig. 18**) (Blaner, 2019). La conversión de la unidad de vitamina A de UI a la unidad métrica, mcg RAE, tiene en cuenta las diferencias en la actividad de la vitamina A entre los retinoles y los carotenoides provitamina A. En la nueva unidad, 1 RAE equivale a 1 mcg de retinol, 12 mcg de beta-caroteno, 24 mcg de alfa-caroteno o 24 mcg de beta-cryptoxantina (FDA, 2019).

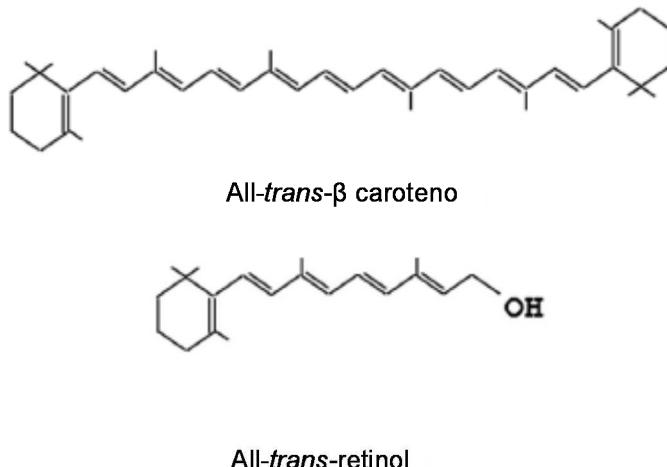


Figura 18. Estructura del All-*trans*-β caroteno y All-*trans*-retinol. Adaptado de Blaner (2019).

Otros carotenoides como el α-caroteno y la β-cryptoxantina tienen también actividad provitamínica, pero es menor que la del β-caroteno. En cambio, moléculas como el licopeno, zeazantina y luteína carecen de esta actividad, pero son moléculas que pueden actuar como antioxidantes (Blaner, 2019). El β-caroteno es capaz de frenar las reacciones en las que interviene el oxígeno singlete, reaccionando con radicales libres tales como radicales peroxilo (ROO^\bullet) (Chisté et al., 2014; Ribeiro et al., 2020), superóxido (O_2^\bullet) e hidroxilo (HO^\bullet) (Trevithick-Sutton et al., 2006; Ribeiro et al., 2020), así como el anión peroxinitrito (ONOO^-) (Panasenko et al., 2000; Ribeiro et al. 2020). Existe una vasta evidencia científica que demuestra que los carotenoides previenen o disminuyen el daño oxidativo al ADN, los lípidos y las proteínas (Agarwal et al., 2012; Kasperczyk et al., 2014; Blaner et al., 2019). Como se mencionó previamente, no todos los carotenoides poseen la misma capacidad antioxidante. Aparentemente, esa capacidad está relacionada con la cantidad de dobles enlaces presentes en la molécula, lo cual determina un nivel de energía más bajo (Murray & Capelli, 2020).

Los principales productos que resultan de la oxidación del β-caroteno son sus epóxidos (**Fig. 19**). La química del antioxidante β-caroteno muestra una alta dependencia de la presión de oxígeno (Chisté et al., 2014). Con una presión baja (<50 Torr), el β-caroteno actúa como un antioxidante que rompe la cadena de oxidación, mientras que, al aumentar la presión de oxígeno, el β-caroteno se auto-oxida fácilmente mostrando un comportamiento pro-oxidante.

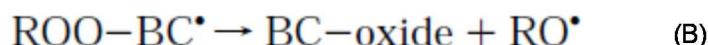


Figura 19. Química de la oxidación del β-caroteno. Adaptado de Chisté et al. (2014). BC: β-caroteno.

Como resultado de la adición reversible de oxígeno al complejo del radical β-caroteno (**Fig. 19 C**), se forma un radical peroxilo reactivo que se propaga a cadenas de radicales. La formación de

productos correlaciona directamente con la presión de oxígeno, sugiriendo la auto-oxidación del β -caroteno. No obstante, las reacciones de epoxidación (**Fig. 19 A, B**) pueden iniciar nuevas propagaciones de radicales (Chisté et al., 2014; Ribeiro et al., 2020).

Ya se han descripto los principales antioxidantes naturales y su mecanismo de anti-oxidación. Sin embargo, cabe señalar que también existen antioxidantes sintéticos que son muy utilizados en la industria de los alimentos ya que están permitidos y regulados por el Código Alimentario Argentino. Debido a que no son objeto de estudio de la presente tesis, sólo se los mencionará y describirá parcialmente a continuación. Los antioxidantes sintéticos o bien las combinaciones de ellos, aceptados a nivel mundial, son compuestos fenólicos sustituidos por grupos hidrocarbonados o bien esterificados como por ejemplo el butil hidroxinasol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT) y el galato de propilo o propil galato (PG) (**Fig. 20**).

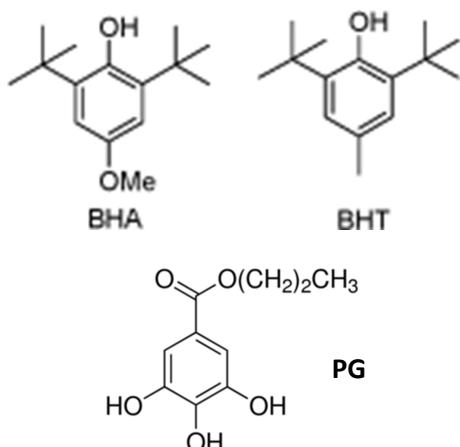


Figura 20. Estructuras químicas de los antioxidantes sintéticos más utilizados: butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxinasol (BHA) y propil galato (PG) (Yehye et al., 2012).

No obstante, la preocupación por su toxicidad y los costos, junto con la preferencia del consumidor con respecto a la seguridad de los aditivos alimentarios, crearon la necesidad de estudiar e identificar fuentes naturales que tengan potencial antioxidante (Cömert & Gökm̄en, 2018).

1.5.6. Medición de la oxidación

Como se describió en los párrafos anteriores la oxidación lipídica no solamente es compleja y consta de varias etapas sino que, además, los productos resultantes de las reacciones son altamente reactivos y atacan a otras moléculas, ya sea de los alimentos como así también del organismo. Por ello es importante contar con metodología analítica que nos permita cuantificar la oxidación para detectar todas las vías activas en una matriz y, de esta manera, evaluar con mayor precisión el impacto de la oxidación en la vida útil del alimento (Schaich et al., 2016).

Existen muchos factores que intervienen en la oxidación lipídica, debido a lo cual hay muchas maneras de evaluarla. A estos métodos de medición los podemos agrupar según lo que se desea medir,

esto es, la pérdida de ácidos grasos insaturados, la concentración de productos primarios de oxidación o la concentración de los productos secundarios. Una forma de medir los productos primarios de oxidación o hidroperóxidos lipídicos es a través del método del valor peróxido (VP). La desventaja que éste presenta es que estos compuestos son inestables porque a medida que prosigue la oxidación se combinan para formar nuevos productos finales. Entre éstos, se producen más de 30 aldehídos, que varían según la naturaleza del sustrato oxidado. El malondialdehído (MDA) es uno de los más fáciles de medir a través de su reacción con el ácido tiobarbitúrico y posee baja toxicidad para el organismo. Otro de los aldehídos que se produce es el 4-hidroxi-nonenal o HNE. A diferencia del MDA, éste último difunde fácilmente a los tejidos y puede causar toxicidad celular (Catala, 2012).

1.5.6.1. Valor peróxido (VP)

Se considera que los hidroperóxidos son el primer producto estable en la oxidación de lípidos (Schaich et al., 2016). El VP se expresa de diversas formas, ya sea como miliequivalentes de oxígeno o hidroperóxidos por kg de grasa. Las concentraciones de hidroperóxido se determinan a partir de curvas estándar. El VP tiene una buena correlación con la respuesta de los paneles sensoriales, estableciendo una escala de "aceptabilidad" donde los aceites frescos tienen $VP < 1$, aceptándose los aceites comerciales industriales con $VP < 5$ y los aceites con $VP = 10$ mEq de hidroperóxido / kg de aceite se consideran rancios y son rechazados por los paneles sensoriales (Catala, 2012; Schaich et al., 2016). De todos modos cabe destacar que no se puede evaluar la oxidación con el VP solamente, ya que un valor bajo puede indicar que ocurrió poca oxidación o también que la oxidación está en otra etapa donde los hidroperóxidos se están descomponiendo a otros productos, como ocurre cuando en las reacciones de oxidación interviene la luz UV o las altas temperaturas. En tanto, un VP alto puede ser indicador de procesos de estabilización de los hidroperóxidos, como ocurre con las bajas temperaturas o mediante enlaces puente hidrógeno entre los hidroperóxidos y antioxidantes fenólicos (Schaich et al., 2016).

1.5.6.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS*)

El ensayo de TBARS mide los productos de degradación secundarios (MDA) que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (**Fig. 21**) cuando se calientan en soluciones ácidas para formar un complejo de color rosado que absorbe en un rango de 532-535 nm y, cuando se excita a 515 nm, emite fluorescencia a 553 nm (Schaich et al., 2016)

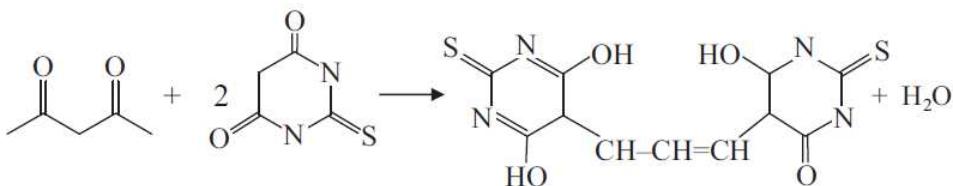


Figura 21. Ensayo de TBARS: reacción de formación del malondialdehído (MDA) con el ácido thiobarbitúrico. Adaptado de Schaich (2016).

Cabe destacar que, en realidad, la reacción es bastante inespecífica e involucra reacciones con alkanos, alquenos y otros compuestos de oxidación aparte del MDA. Esto puede distinguirse por cambios en los máximos de absorción que se dan a otras longitudes de onda. Si bien este método presenta esta desventaja, es uno de los más utilizados para medir productos de reacción secundaria ya que es simple, confiable, correlaciona bien con el análisis sensorial y ofrece un panorama bastante certero del estado de oxidación de la muestra analizada (Schaich et al., 2016).

Al realizar el ensayo se deben tener en cuenta dos consideraciones importantes. La primera es que, para cuantificar la absorbancia, se deben realizar curvas de calibración preparadas a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), que se hidroliza en medio ácido para dar MDA. La segunda consideración es que, para tener resultados confiables, las muestras se deben comparar con blancos de reacción para determinar el porcentaje de analitos que resisten las condiciones de reacción. Este factor se incluye luego en los cálculos finales del valor de TBARS, que se expresan generalmente como μmol de TBARS / g de muestra, o mg de MDA / kg de muestra (Schaich et al., 2016).

Debido a las desventajas que presenta este método es que muchos investigadores sugieren que la oxidación no se mida o estime realizando solamente el ensayo TBARS, sugiriendo, además, la detección por HPLC de las especies individuales para no cometer errores a la hora de subestimar o sobreestimar la oxidación de una muestra (Caprioli et al., 2011; Schaich, 2016; Zhang et al., 2018).

1.6. Queso

Según el Código Alimentario Argentino (Artículo 605 - Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006) "Se entiende por Queso el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes. Se entiende por Queso Fresco el que está listo para el consumo poco después de su fabricación. Se entiende por Queso Madurado el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso.

En 2011, la producción mundial de queso alcanzó los 20 millones de toneladas, manteniendo un crecimiento sostenido durante el 2012 y 2013. En la **Tabla 9** se muestra la estimación global (World Cheese Market Report 2000-2020), en la que se incluye el 80% de la producción de quesos elaborados a partir de la leche bovina, entregados a las bocas de venta. El 20% restante son quesos de otras especies (oveja, cabra y búfalo) y productos elaborados de manera agrícola o casera.

Países como Estados Unidos y Alemania han expandido su capacidad de producción de queso y más del 40% de la leche para procesamiento se la destina para su producción. Por su parte, la producción de queso en Francia, Italia y Holanda aumentó de manera más moderada, pero constantemente. Países de Europa del Este también han experimentado un crecimiento significativo en la producción de queso estimulado por la adhesión a la UE en 2004: Polonia con 77%, Lituania 195% y República Checa con 21% (The World Cheese Market Report 2000-2020).

Tabla 9. Producción de queso (en toneladas) en varios países (período 2000-2012 y previsión 2019).¹

País	2000	2012	Variación	2020	Variación
1.Estados Unidos	3,746	4,950	32%	6,000	21%
2.Alemania	1,686	2,430	44%	2,860	18%
3.Francia	1,612	1,842	14%	2,100	14%
4.Italia	927	985	6%	1,100	12%
5.Holanda	684	762	11%	880	15%
6.Egipto	380	720	89%	980	36%
7.Polonia	404	718	77%	850	18%
8.Brasil	445	254	57%	900	28%
9.Turquía	250	330	132%	800	243%
10.Argentina	443	564	27%	700	24%
11.Rusia	221	410	85%	480	17%
12.Reino Unido	302	398	32%	470	18%
13.Nueva Zelanda	289	354	22%	480	36%
14.Canadá	292	345	18%	430	25%
15.Australia	376	346	-10%	390	30%
16.Irán	221	320	44%	550	72%
17.España	243	311	28%	350	13%
18.Dinamarca	306	300	-2%	370	23%
19.México	134	264	97%	290	10%
20.Ucrania	67	260	295%	320	23%
21.Suecia	127	101	-20%	85	-16%
22.Irlanda	99	185	86%	260	41%
23.Austria	119	163	37%	200	23%
24.Bielorusia	41	150	265%	210	40%
25.Lituania	40	121	195%	140	16%
26.Finlandia	98	120	22%	129	8%
27.República Checa	92	111	21%	130	17%
28.Suiza	167	180	20%	210	16%
29.Bélgica	58	95	64%	95	0%
30.Chile	52	82	58%	112	37%

¹Datos de The World Cheese Market Report 2000-2020.

En América Latina, los principales países productores de queso también han ampliado la producción. Brasil, Argentina y Chile han aumentado con 57%, 27% y 58% (The World Cheese Market Report 2000-2020; Cheese Market – Latest Industry Trends and Global Insights 2018–2025, 2019).

1.6.1. Propiedades fisicoquímicas y microestructura del queso

Como se mencionó anteriormente, las caseínas (α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína) son las principales proteínas de la leche. También se describió que, al igual que la mayoría de las proteínas, tienen secciones hidrofóbicas, hidrofílicas y poseen grupos fosfato unidos covalentemente. En su forma nativa (Fig. 22), las caseínas se encuentran formando micelas con un diámetro de 15 a 20 nm compuestas internamente por alrededor de 10000 cadenas polipeptídicas con α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseína (Kapoor & Metzger, 2008). Las caseínas se han descrito como proteínas reomórficas, indicando que cuando están en solución (en la leche, por ejemplo), las moléculas adoptan estructuras que dependen de las condiciones del medio, siendo abiertas y flexibles. Su conformación abierta permite un fácil acceso a las enzimas proteolíticas, facilitando la desestabilización (Horne, 2016).

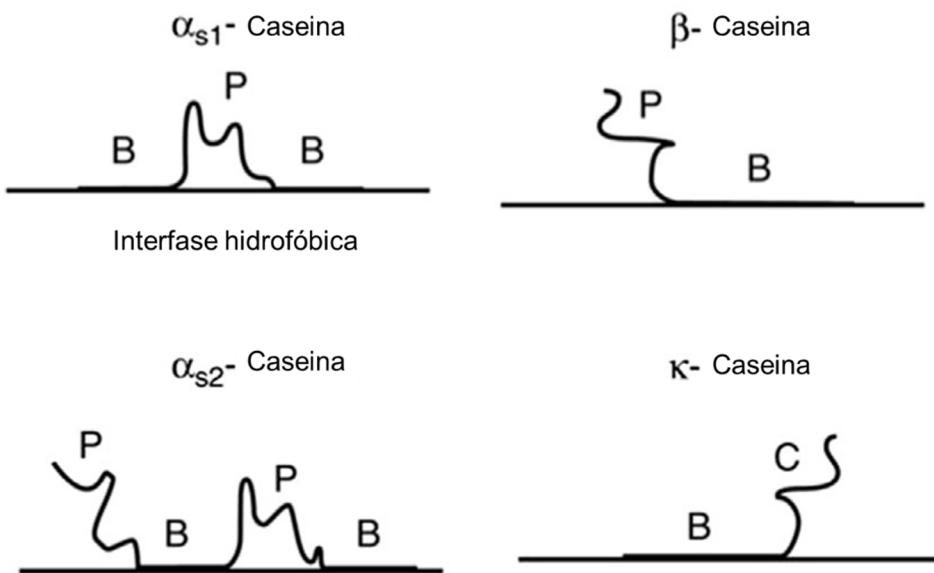


Figura 22. Representación esquemática de las micelas de caseína en una interface hidrofóbica. Las regiones hidrofóbicas (B) están representadas por líneas que no implican rigidez; las regiones hidrofílicas que contienen grupos de fosfoserina se indican con P y el casein-macropéptido hidrofílico de la κ -caseína con C. Adaptado de Horne (2016).

En solución, las caseínas se estabilizan mediante interacciones hidrofóbicas proteína-proteína y entrecruzamientos (*crosslinks*) mediados por fosfato de calcio coloidal. La κ -caseína está presente principalmente en la superficie de la micela, con su región hidrofóbica incrustada en la micela, mientras que la cola hidrofílica glicosilada se extiende hacia el exterior (Horne, 2016). Esta estructura glicosilada de la κ -caseína está cargada negativamente, lo que hace que las micelas se repelan entre sí,

proporcionándoles estabilidad, por lo que protege a los componentes α_s (α_{s1} y α_{s2}) y a la β -caseína de la exposición al medio ambiente (Kapoor & Metzger, 2008; Horne, 2016).

Durante la fabricación del queso se emplea el cuajo para producir la precipitación de la leche, produciéndose el corte de la κ -caseína en la posición Phe-105 y Met-106 y, de esta manera, la cola hidrofílica se desprende, lo cual produce la pérdida de estabilidad, quedando expuestas al medio las α_s - y la β -caseína. Los residuos de fosfoserina presentes en las α_s - y la β -caseína producen entrecruzamientos mediados por iones calcio entre estas moléculas y el fosfato-paracaseinato, formando así un complejo rígido, insoluble en agua, comúnmente conocido como cuajada (Kapoor & Metzger, 2008; Horne, 2016). La fase grasa está emulsificada en este complejo de fosfato de paracaseinato de calcio, y tanto la fase grasa como la fase acuosa se encuentran conformando una red insoluble en agua (Fig. 23) (Kapoor & Metzger, 2008).

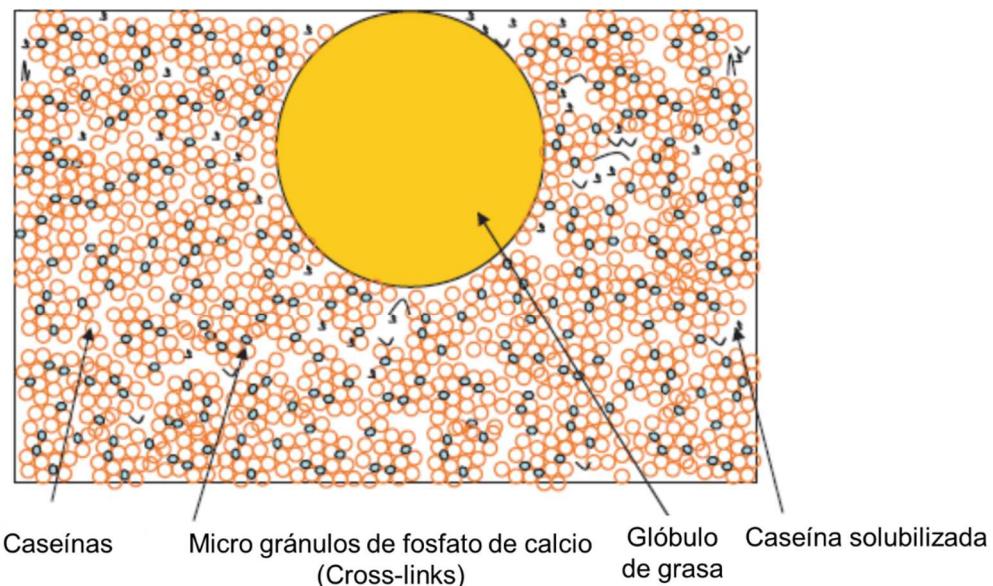


Figura 23. Esquema de la microestructura de la cuajada. Adaptado de Kapoor & Metzger (2008).

El tamaño del polímero de α_s -caseínas o de la micela de β -caseína producida por la autoasociación depende del pH, la fuerza iónica y también, para el caso de la β -caseína depende de la temperatura. El equilibrio de fuerzas de atracción y repulsión controla el tamaño del agregado (Kapoor & Metzger, 2008; Horne, 2016).

Un punto importante que se debe desarrollar son las asociaciones con los iones Ca^{2+} y la precipitación inducida por calcio. El grado de unión del calcio está directamente relacionado con el número de residuos de fosfoserina y es debido a esto que las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β tienen altas capacidades de unión al ión calcio como así también a otros iones divalentes. La κ -caseína, por su parte, posee sólo un residuo de fosfoserina, lo que resulta en una pobre asociación al calcio, no precipita en su presencia y, en mezclas con otras caseínas, se restringe el crecimiento (Horne, 2016).

Cuando las caseínas se asocian al Ca^{2+} , la carga negativa de la molécula disminuye, dando como resultado la precipitación de la proteína. La velocidad de precipitación (inducida por calcio) puede ser cuantitativamente relacionada con el cuadrado de la carga neta de la proteína (Q). Así, la relación entre el $\log(CT)$, donde CT es el tiempo de coagulación, y Q^2 (el cuadrado de la carga neta de la proteína) es lineal y con pendiente positiva (Horne & Moir, 1984). Esta relación también se mantiene cuando la carga sobre la proteína es cambiada por modificación química. Por ello, convirtiendo un residuo de lisina positivamente cargado en un residuo neutro o aún en un residuo negativamente cargado, aumenta la carga negativa de la proteína (aumenta Q) en una o dos unidades y disminuye la velocidad de precipitación (aumenta CT) inducida por calcio, en consecuencia. La carga neta de la proteína (Q) está relacionada con los iones calcio combinados, por la siguiente ecuación:

$$Q = Z_O + 2v$$

donde Z_O es la carga de la proteína al pH y la fuerza iónica de interés y v es el número de iones calcio unidos para esa concentración de iones calcio añadidos (Horne, 2016).

El calcio también es uno de los componentes que influyen en la textura elástica del queso. Esta propiedad es fundamental, ya que para el caso de quesos que forman ojos (Gruyere, Emmental o Gouda) se necesita cierta elasticidad de la matriz para que el gas se disponga en burbujas sin que estallen provocando la ruptura y el defecto en el queso. Por otro lado, una textura elástica del queso va a hacer que el producto, cuando sea sometido a fuerzas de cizalla (corte), no se desmenuce, fracture o bien se adhiera en mayor o menor medida a los implementos de corte. Además, la dureza del queso, debido al aumento en la concentración de calcio, puede afectar la bioaccesibilidad de los nutrientes ya que existe evidencia científica que muestra un aumento en los tiempos de desintegración en modelos *in vitro* (Guinee, 2016; Lamichhane et al., 2018).

1.6.2. Maduración del queso

Durante la maduración del queso, la estructura tridimensional de la red proteica se modifica por efecto de procesos físicos, químicos y biológicos como la proteólisis, la desmineralización de la caseína y la hidratación de las redes de caseína (para el caso del queso mozzarella) (Lamichhane et al., 2018). Factores como actividad residual de coagulantes, enzimas lácteas autóctonas, enzimas producidas por bacterias *starters* y *no starters*, influyen sobre el grado de la proteólisis del queso. En relación a la actividad residual de los coagulantes puede decirse que, si bien se observa cierta actividad durante el madurado, esta no es significativa ya que suele inactivarse por la aplicación de calor durante y luego de la formación de la cuajada (Guinee, 2016; Lamichhane et al., 2018).

La plasmina es una enzima proteolítica endógena de las más importantes que posee la leche. En quesos de alto nivel de cocción (ej. Emmental y Grana) su actividad es elevada con respecto a la que presentan los quesos de baja cocción (ej. Cheddar). Esto puede ser debido a que los inhibidores plasminógenos se inhiben por el calor (Lamichhane et al., 2018). El pH óptimo de esta enzima es 7,5, con lo que contribuye a la maduración de quesos madurados con moho como el Camembert y

Roquefort. El grado de hidrólisis de la caseína está influenciado por múltiples factores como el tipo de queso, la temperatura durante el proceso de maduración, la composición del queso y el nivel y el tipo de coagulante utilizado (Guinee, 2016; Lamichhane et al., 2018). Aparentemente, la hidrólisis parcial de la α_{s1} -caseína correlaciona positivamente con el ablandamiento de la red proteica. Sin embargo, algunos estudios afirman que la solubilización del fosfato de calcio coloidal es también responsable del ablandamiento (Lamichhane et al., 2018).

También existen reportes en donde la hidrólisis de la α_{s1} -caseína y β -caseína varía de acuerdo al microorganismo *starter* utilizado (*Lactobacillus helveticus* o *Lactobacillus delbrueckii*), impactando directamente en la capacidad de estiramiento del queso estudiado (Richoux et al., 2009; Lamichhane et al., 2018). Además, la capacidad de estiramiento se correlacionó con péptidos hidrofóbicos, los que pueden interactuar con la matriz proteica o con otros péptidos grandes a través de fuerzas hidrofóbicas, posiblemente formando fibras en la matriz del queso (Richoux et al., 2009).

Durante la etapa de madurado también se producen una serie de compuestos que permiten que el queso tenga aromas y sabores particulares. Estos compuestos se denominan volátiles e involucran componentes de la matriz láctea como lactosa, lactato y citrato residuales, así como los productos de los procesos de lipólisis (liberación de ácidos grasos) y de proteólisis (liberación de péptidos y aminoácidos) mencionados anteriormente (Ianni et al., 2020). La hidrólisis de los triglicéridos libera ácidos grasos, los cuales en parte son transformados por la actividad enzimática microbiana en ácidos carboxílicos de cadena corta, alcoholes, ésteres, lactonas y alcoholes secundarios. El catabolismo de los aminoácidos libres por reacciones de decarboxilación, eliminación y transaminación representa la principal ruta involucrada en la producción de aldehídos (ej. 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal), alcoholes, ácidos carboxílicos, aminas y compuestos sulfurados que contribuyen al aroma y que se desarrollan durante la maduración del queso por acción de las enzimas microbianas (ej. del *Lactobacillus paracasei*, del *Lactococcus lactis* var. *maltigenes*). Además, también se deben incluir reacciones entre ácidos grasos libres y péptidos originados por la proteólisis, que dan también lugar a una amplia gama de compuestos volátiles que incluyen ácido acético, butírico, isobutírico, propiónico, isovalérico, isocaproico, 4- y 6-metil pentanoico, entre muchos otros (Ianni et al., 2020). La dieta de los rumiantes afecta la presencia de determinados compuestos precursores de los volátiles y modifica así el flavor. Los polifenoles provenientes de la dieta se depositan en la grasa animal y aparecen en la leche, estando generalmente asociados a notas placenteras del aroma, siempre y cuando no estén estos fenólicos presentes en concentraciones relativamente elevadas. El perfil de fenólicos varía con el tipo y composición de la dieta (ej. pastoril o a base de granos, suplementos). Volátiles como los aldehídos pueden derivar también de reacciones de auto-oxidación no enzimática de los ácidos grasos no saturados libres y esterificados. Aunque estas reacciones no ocurren con elevada frecuencia debido a que los quesos se caracterizan por tener un medio reductor, ellas son responsables de la liberación de aldehídos de cadena lineal que producen notas de flavor placenteras. Matrices lácteas ricas en ácidos grasos poli-insaturados son proclives a presentar estas reacciones oxidativas con la formación de este tipo de aldehídos (Ianni et al., 2020).

1.6.3. Fase grasa en los quesos

Cuando se produce la precipitación de la proteína, los glóbulos de grasa quedan atrapados en la red proteica. Estos pueden permanecer intactos (esféricos y cubiertos con materiales de la membrana nativa), agrupados con otros glóbulos de grasa, fusionados (esféricos, pero de mayor tamaño que los originales presentes en la leche), o bien con una conformación directamente no globular (Lamichhane et al., 2018), tal como puede verse en la **Figura 24**.

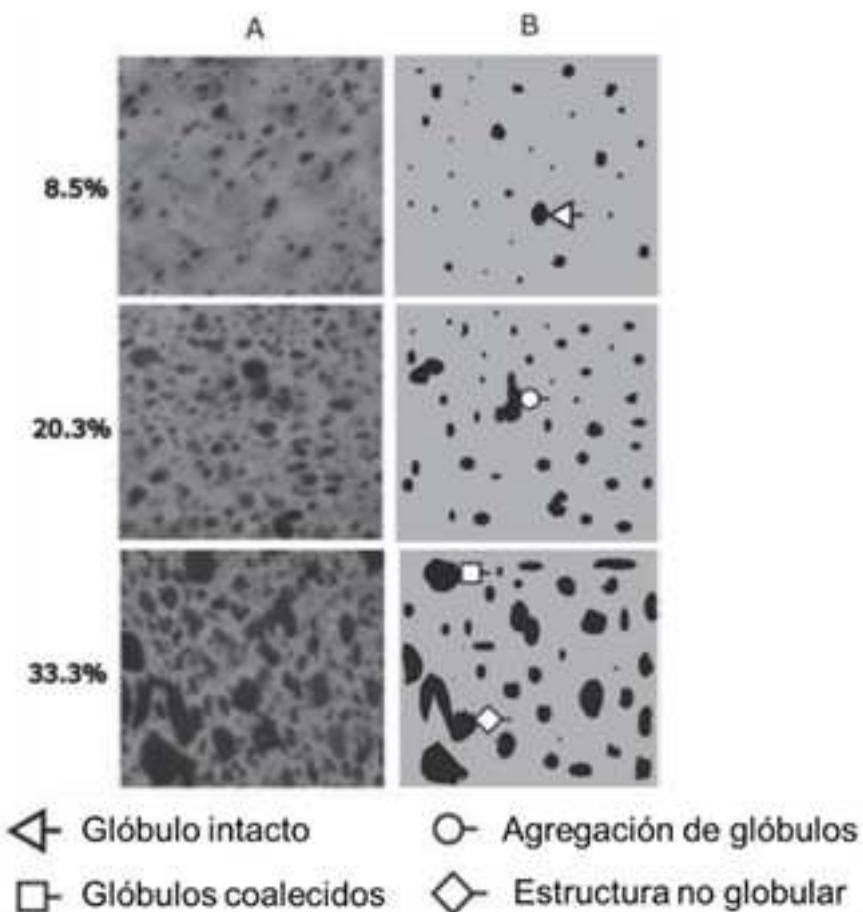


Figura 24. Microscopía confocal de barrido láser: Estructura de los glóbulos de grasa. Adaptado de Lamichhane et al. (2018).

En la columna A de la **Figura 24**, se observan las microscopías obtenidas a partir de queso Cheddar de 12 semanas de maduración y con 3 niveles de grasa (8,5; 20,3 y 33,3 %). En la columna B se observa la representación esquemática de la microscopía con las distintas conformaciones que adoptan los glóbulos de grasa dentro de la matriz proteica (Lamichhane et al., 2018).

El tamaño y forma de los glóbulos de grasa como así también el porcentaje de grasa tienen impacto en las propiedades físicas del queso. Además de lo mencionado, la composición de los ácidos grasos que componen esa grasa (la que, a su vez varía con la alimentación suministrada al rodeo, raza,

genética, etc.) también tendrá un impacto sobre estas propiedades (Bocquel et al., 2016; Lamichhane et al., 2018).

Como se observa en la **Figura 24**, la reducción del porcentaje de grasa sin un aumento del nivel de humedad tiene como consecuencia una variación de la relación grasa/proteína, aumentando la concentración de proteína y logrando una matriz más compacta con menor grado de coalescencia. Este aumento en el porcentaje de proteínas tiene consecuencias en la textura, en la opacidad de la matriz, así como en las propiedades reológicas, sensoriales y de cocción del queso (Guinee, 2016; Lamichhane et al., 2018). Es importante destacar que cuando se trata de productos *light* o reducidos en grasa, o de productos con ingredientes funcionales (como sería el caso del desarrollo de la presente tesis), la relación grasa/proteína se ve modificada ya sea por la reducción de la grasa láctea o bien por la sustitución o el reemplazo de la grasa láctea. Comprender bien el impacto es fundamental para poder predecir de manera acertada el comportamiento durante el consumo del producto (Thionnet et al., 2017).

1.6.4. Fase acuosa en los quesos

El agua también es un constituyente fundamental del queso. Su distribución y la manera en la que se encuentra asociada o no a los distintos compuestos que conforman la matriz del queso dependen de múltiples factores que van desde el tipo de queso hasta la edad de maduración. En la mayoría de los casos, el agua se encuentra dentro de la matriz proteica, pero en quesos que prácticamente no son madurados como el queso mozzarella, la mayor cantidad de agua se encuentra entrampada en canales denominados “grasa-suero”. A medida que el madurado transcurre, el agua se absorbe en la matriz de proteínas (Smith et al., 2017; Lamichhane et al., 2018).

Existe una correlación positiva de acuerdo al contenido de humedad y ablandamiento del queso. Esto se debe a que el agua en la matriz del queso desempeña, por un lado, un rol de plastificante (lubricante de baja viscosidad) y, por otro lado, al aumentar el nivel de humedad, disminuye la relación caseína/agua. Ambos a su vez se encuentran influenciados por parámetros como el pH, la fuerza iónica y los niveles de fosfato de calcio coloidal (Lamichhane, 2018).

Es importante destacar que en la fase acuosa se presentan una serie de compuestos que influyen tanto en las propiedades texturales como en las propiedades sensoriales del queso. Se trata de proteínas solubles en agua, enzimas, péptidos, aminoácidos libres, minerales, carbohidratos (lactosa, galactosa y glucosa) y ácidos orgánicos (Lamichhane et al., 2018).

El cloruro de sodio (NaCl) es un compuesto que se añade al queso con la finalidad de conservar (por depresión de la actividad agua) y resaltar su sabor. Sin embargo, también contribuye a las interacciones agua-proteína, pudiendo llegar a hidratar y solubilizar las caseínas, lo que se encuentra ampliamente documentado ya que son varios los autores que han reportado un aumento en la concentración de proteínas disueltas al aumentar el contenido de sal. Sin embargo, el aumento en la concentración de sal puede llevar a un aumento en las interacciones proteína-proteína y así a su

agregación, efecto conocido como *salting-out* (Guinee, 2004; Everett et al., 2014; Guinee, 2016; Lamichhane et al., 2018).

La mayoría de los quesos tienen actividades de agua comprendidas entre 0,940 y 0,980, y no menor a 0,920 (Trmčić et al., 2017).

1.6.5. Efecto del pH

El pH tiene un rol fundamental sobre la microestructura del queso, impactando directamente en la textura, las propiedades reológicas y las propiedades de cocción del queso. A un pH más elevado (valores de aproximadamente 5,4) la concentración del calcio micelar es elevada, con lo que se promueve la interacción caseína-caseína, dando ello como resultado el aumento en la rigidez del gel y un queso más elástico, más firme y menos fundible. Cuando el pH ronda los 5,1, las interacciones entre caseínas disminuyen porque están cargadas negativamente, solubilizándose el calcio micelar y dando como resultado un queso más suave y fundible. Sin embargo, si el pH disminuye fuertemente hacia valores de 4,7, las interacciones caseína-caseína aumentan ya que el pH del medio se encuentra cerca del punto isoeléctrico, afectándose nuevamente las propiedades de fusión, fluidez y estiramiento (Pastorino et al., 2003; Harte, 2007; McAuliffe et al. 2016).

También el pH influye sobre el tamaño y la disposición de los agregados de proteínas en la matriz proteica. Según el trabajo de Pastorino et al. (2003a), el diámetro de los agregados de proteína fue de alrededor de 10-12 nm a pH 5,3, mientras que el tamaño fue de 2-4 nm a pH 4,7. Además, en el primer caso, los agregados estaban mejor definidos y organizados que en el segundo caso. El pH produce modificaciones en las cargas de las proteínas y en el medio circundante, lo cual trae aparejado que el grado de *crosslinking*, la orientación y la regularidad de la estructura formada durante la cuajada impacte sobre la microestructura del producto final.

Como se observa, variaciones de pH, tanto desde el proceso de elaboración como durante el madurado, influyen en las interacciones moleculares y pueden conducir a defectos en la microestructura del queso. Es por esta razón que se debe continuar investigando para comprender mejor los efectos y sus causas en este tema.

1.6.6. Efecto de la temperatura

La temperatura es, sin duda, otra de las variables que afectan la estructura del queso ya que impacta directamente en los cambios de estado físico de la grasa y, además, modifica las interacciones entre las caseínas. Comprender estos cambios y su impacto en la estructura es importante debido a la gran diversidad de quesos que pueden consumirse calentados, o bien sin calentar (Lamichhane et al., 2018).

A bajas temperaturas, la grasa se presenta en estado sólido, reforzando la estructura y contribuyendo a las propiedades elásticas del queso. Además, el área de contacto de las caseínas aumenta cuando la temperatura es baja, esto es por el debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas.

Estas causas, combinadas con la ayuda de las bajas temperaturas contribuyen a una estructura más firme del queso (Shima & Tanimoto, 2016).

Sin embargo, cuando el queso se somete a temperaturas de apenas 40°C, casi toda la grasa del queso se encuentra fundida. Esta grasa en estado líquido actúa como plastificante dando como resultado un queso más suave y extensible. Sin embargo, las interacciones entre caseínas también se ven afectadas por acción de la temperatura, contribuyendo a los efectos antes mencionados. Aparentemente, cuando la temperatura es elevada, las redes de caseína en el queso se contraen, probablemente debido al fortalecimiento de las interacciones hidrofóbicas. Esta contracción conduce al debilitamiento de la matriz durante el calentamiento, disminuyendo los módulos elástico (G') y viscoso (G'') del espectro mecánico del queso (Lamichhane et al., 2018; Panthi et al., 2018).

Como se observa, variaciones del pH y de la temperatura, tanto desde el proceso de elaboración, el madurado y el consumo, influyen en las interacciones moleculares y pueden conducir a efectos deseables o indeseables en la microestructura del queso. Es por esta razón que comprenderlos e investigarlos ayuda a predecir tanto su comportamiento como la funcionalidad del producto a lograr.

1.7. Tipos de quesos producidos en Argentina

Antes de detallar qué tipos de queso se producen en nuestro país, debemos clasificarlos. La clasificación más común que se realiza es según el contenido de grasa. De acuerdo a esto, los quesos se clasifican según el Código Alimentario Argentino en:

- Extra graso o Doble crema: cuando contengan no menos del 60%.
- Grasos: cuando contengan entre 45,0 y 59,9%.
- Semigrasos: cuando contengan entre 25,0 y 44,9%.
- Magros: cuando contengan entre 10,0 y 24,9%.
- Descremados: cuando contengan menos de 10,0%.

También pueden clasificarse según su contenido de humedad (Código Alimentario Argentino) en:

- Quesos de baja humedad (generalmente conocidos como de pasta dura): humedad hasta 35,9%.
- Quesos de mediana humedad (generalmente conocidos como de pasta semidura): humedad entre 36,0 y 45,9%.
- Quesos de alta humedad (generalmente conocidos como de pasta blanda o macios): humedad entre 46,0 y 54,9%.
- Quesos de muy alta humedad (generalmente conocidos como de pasta muy blanda o mole): humedad no menor a 55,0%.

En Argentina, actualmente se estima un consumo de 12,9 kg/año/habitante, distribuidos de la siguiente forma (Statista, 2018; Asociación de Pequeñas y Medianas Empresas Lácteas APyMEL 2019):

- Pasta semidura 4 kg/año/habitante, siendo la variedad Tybo la más consumida.
- Pasta blanda 6 kg/año/habitante, en donde el Cremoso, Por Salut y Mozzarella son los más consumidos.
- Pasta dura 1,5 kg/año/habitante, en donde el Reggianito y el Sardo son las variedades más consumidas.

En lo que a producción respecta, en la **Tabla 10** se muestran los principales quesos producidos en Argentina, discriminándose por el animal productor (vaca, cabra, búfalo, oveja) (APyMEL, 2019):

Tabla 10. Tipos de queso producidos en la República Argentina¹.

Variedad	Animal productor			
	Vaca	Cabra	Búfalo	Oveja
Azul	•			
Blanco	•			
Cremoso	•			
Criollo	•			
Cuartirolo	•			
Edam	•			
Fontina	•			
Fynbo	•			
Gouda	•			
Gruyere	•			
Gruyero	•			
Holanda	•			
Mini-Fynbo	•			
Mozzarella	•		•	
Queso barra (Pategras)	•			
Pepato	•			
Por salut	•			
Provolone	•			
Provolone hilado	•	•		
Quesillo	•	•		
Queso pasta blanda		•		•
Queso pasta dura		•		
Queso pasta semi- dura		•		•
Queso feta		•		
Reggianito	•			
Romano	•			

Sbrinz	•
Tandil	•
Tybo	•

¹ Fuente APyMEL (2019).

1.7.1. Quesos funcionales en la Argentina y en el mundo

En el punto 1.3.2 correspondiente a “Alimentos funcionales con fitoesteroles” se detallaron algunos alimentos funcionales adicionados con fitoesteroles que se encuentran actualmente disponibles en ciertas tiendas de diversos países. De lo mencionado en este punto puede observarse que son pocos los ejemplos de quesos funcionales que se encuentran actualmente a disposición del público, siendo los ejemplos más abundantes, las bebidas lácteas fermentadas, las margarinas y los yogures. Mientras que en el punto 1.6 correspondiente a “Quesos” se detalló que diversos autores consideran a los quesos como productos funcionales debido a la presencia de determinados compuestos (péptidos, dipéptidos, vitaminas y determinados antioxidantes), no se debe perder de vista un punto importante que contempla la definición de alimento funcional dada por Diplock et al., (1999): “...debe demostrar su efecto benéfico cuando se lo consume en las cantidades en las que normalmente se espera que sea consumido en la dieta”, es decir, se debe tener en cuenta la concentración de estas moléculas y, a su vez, la cantidad de alimento (en este caso, queso) que se debe ingerir para alcanzar la concentración óptima de molécula bioactiva, cualquiera sea ésta, que llevará adelante el efecto benéfico en el consumidor (El Sohaimy, 2012; Reis et al., 2017).

Recurriendo a la revisión bibliográfica, se pueden encontrar numerosas investigaciones que hablan de quesos funcionales pero la gran mayoría de estos estudios hablan de quesos a escala laboratorio o de quesos análogos (Chandan & Kapoor, 2011; Guinee, 2011). Estos análogos de queso deben estar protocolizados y debidamente controlados para lograr que ese procedimiento sea lo más aplicable posible. La funcionalidad de estos análogos está influenciada por la micro y macroestructura, las que a su vez se ven afectadas por factores tales como las condiciones de procesamiento y la composición (Fox et al., 2017b). En puntos tratados anteriormente se mostró que existe evidencia de que el tipo de grasa utilizado, las proteínas del suero y las propiedades físico-químicas de los componentes (grado de agregación o hidratación de proteínas, distribución de tamaño de las gotas de aceite emulsionado) e interrelaciones entre los componentes (relación proteína/grasa, por ejemplo), son los principales determinantes de las propiedades reológicas y funcionales del producto final (Kapoor & Metzger 2008; Lamichhane et al., 2018; Panthi et al., 2018).

Es importante tener en cuenta que la formulación de estos análogos consiste en una combinación de fuentes de proteínas, grasas/aceites y agua como ingredientes claves. Otros ingredientes pueden ser los hidrocoloides, agentes acidificantes, compuestos bioactivos, sabores y conservantes (Guinee, 2007; Guinee, 2016).

La mayoría de las formulaciones de estos análogos están patentadas, así como los protocolos de fabricación. El objetivo de la mayoría de las investigaciones, consisten en evaluar el impacto del tipo

y cantidad de componentes en la mezcla y en el producto final, pero se observan pocas publicaciones que investigan a los quesos como un posible vehículo de moléculas bioactivas (Guinee, 2016).

En contraposición a lo dicho en el párrafo anterior, existe un antecedente en Australia en donde la empresa Kraft Foods Ltd. presentó una patente en el año 2008. La invención trataba de queso procesado tipo cheddar *light* (LiveActive®) (<12 g de grasa por 100 g de queso) que contenía niveles equivalentes a 1,1 g de fitoesteroles libres por cada 20 g de queso. Este producto se comercializó dividido en porciones e informaba a los consumidores la cantidad de esterol vegetal en cada porción, de manera de permitirles conocer la cantidad óptima de queso a ingerir para lograr el efecto deseado (Foods Standards Australia New Zealand, 2008).

En Argentina, en el año 2004, un grupo de investigadores de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) en conjunto con el CONICET y la empresa Sucesores de Alfredo Williner S.A. lanzaron al mercado un queso funcional denominado BioQueso IOLAY Vita ®. Para este caso, el producto contenía bacterias probióticas. Los científicos a cargo de la investigación y desarrollo evaluaron la viabilidad de varias combinaciones de cultivos de distintas bacterias probióticas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) durante el almacenamiento refrigerado, constatando su arribo como células viables al intestino, es decir, llegaban vivas hasta el intestino grueso, donde ejercen los efectos positivos para la salud (Prosello et al., 2003; Universidad Nacional del Litoral, 2004).

El desarrollo de alimentos funcionales es un ejemplo de vinculación entre el conocimiento nutricional y de salud y el aprovechamiento de oportunidades por parte de la agroindustria y de la industria alimentaria. El empleo de productos lácteos funcionales proporciona la oportunidad de combinar alimentos de amplio uso y aceptabilidad con moléculas biológicamente activas para corregir pequeñas disfunciones metabólicas que pueden conducir a enfermedades crónicas. Este es el caso de los alimentos que puedan reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares por su efecto hipocolesterolémico. En Estados Unidos, los fitoesteroles son calificados “Generally Regarded as Safe” (GRAS) por la FDA (2012) para su utilización en productos alimenticios.

Mientras tanto en la Unión Europea, el uso de fitoesteroles, fitostanoles y sus ésteres en los alimentos está regulado por el Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo desde enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (European Parliament and the Council, 1997).

Como quedó anteriormente en evidencia, no existe en el país este tipo de producto y sólo se desarrollan algunos prototipos de quesos con fitoesteroles en Australia y Europa, haciendo que el producto desarrollado en la presente tesis abastezca un nicho del mercado casi de manera exclusiva.

2. Planteo de hipótesis

Es posible elaborar quesos funcionales debido al agregado de fitoesteroles, con distribución homogénea de los mismos para asegurar la concentración o dosis requerida por porción (feta de 60 g), con estabilidad oxidativa y calidad sensorial semejante a la de otros productos de su misma generación o mejorados. En caso de ser necesario, la estabilidad oxidativa se podrá lograr finalmente mediante el agregado de α -tocoferol como aditivo natural antioxidante. Esto determinará que, secundariamente, el queso desarrollado actuará simultáneamente como fuente parcial de tocoferoles, ya que el nivel propuesto de α -tocoferol como preservativo antioxidante en el queso funcional (6,2 mg/60g de queso) corresponderá, simultáneamente, al 25% de la dosis diaria recomendada (DDR) de vitamina E.

Es posible lograr quesos con el agregado de fitoesteroles en su matriz y que este producto sea estable, sin que la adición de estos compuestos constituya un cambio sustancial en el proceso tradicional de elaboración de queso en la planta y, por lo tanto, sin aumentar significativamente los costos de operación.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Generar las herramientas científico - tecnológicas para la incorporación de componentes de origen vegetal (fitoesteroles y tocoferoles) para la elaboración de quesos funcionales y estudiar las características físico-químicas de las matrices modificadas con dichos compuestos. El producto lácteo funcional fue desarrollado en el marco de un proyecto FONARSEC (FITS 2010- "Desarrollo de alimentos lácteos funcionales 0004") de vinculación entre el grupo del "Laboratorio de Vitaminas, Antioxidantes y Compuestos Funcionales" del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) del INTA-Castelar (Morón, provincia de Buenos Aires) como sector científico-tecnológico y la empresa "CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A." (Villa María, provincia de Córdoba). Este proyecto conllevó la creación del Consorcio CAPP "CIA-Lácteos Capilla del Señor". Así, el objetivo principal del proyecto fue obtener un producto comercial a escala industrial orientado a satisfacer las demandas de los consumidores en lo que compete a la prevención de enfermedades asociadas al colesterol. Este tipo de quesos es novedoso en Argentina y hay muy pocos desarrollos a nivel mundial.

3.2. Objetivos particulares

- Generar conocimiento tecnológico sobre las etapas críticas de la elaboración a escala piloto y escalado industrial de quesos de pasta blanda con el agregado de fitoesteroles en una dosis funcional diaria de más de 2,2 g (cada 60 g de queso o dos porciones de 30 g) y vitamina E (6,2 mg de α -tocoferol cada 60 g de queso) como antioxidante natural.
- Generar conocimiento metodológico para la detección y cuantificación de compuestos funcionales en las matrices lácteas y mezclas de las mismas (HPLC con detección evaporativa para mezcla de compuestos funcionales en leche, crema y quesos).
- Determinar el nivel de oxidación y el efecto de los antioxidantes naturales originales y de los agregados en dichas matrices sobre los parámetros físico-químicos, teniendo en cuenta el cambio de composición producida al incorporar diferentes proporciones de compuestos funcionales de origen vegetal a leche, crema y queso.
- Elaborar el producto a escala piloto.
- Elaborar el producto a escala industrial.
- Determinar la vida útil del queso funcional finalmente obtenido

A los fines de esta tesis, se utilizó el modelo *Technology Readiness Levels* (TRL's) que se describirá posteriormente, el cual fue modificado y adaptado, pudiendo diferenciarse tres etapas o partes experimentales bien definidas:

Parte experimental 1

Estudio de la incorporación, detección y cuantificación de los fitoesteroles funcionales en la leche, la crema y el queso.

Se trabajó con formulaciones de distintos niveles de fitoesteroles en esas matrices y se realizó la caracterización del producto. En esta etapa se analizará la dinámica de incorporación de los fitoesteroles comerciales disponibles y su efecto sobre las características físico-químicas de la matriz, la recuperación de los compuestos funcionales, la composición de ácidos grasos, el perfil antioxidante.

El estudio de incorporación se realizó en quesos a escala laboratorio (un litro de leche) elaborados en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Rafaela provincia de Santa Fe (EEA-Rafaela). Se analizó la retención de los compuestos funcionales y de las vitaminas antioxidantes en el producto final (por cada elaboración, se obtuvieron 100 g aproximadamente de queso "Por Salut") en el Instituto de Tecnología de Alimentos del INTA Castelar (provincia de Buenos Aires).

Simultáneamente se realizaron visitas a la planta industrial CDS-Lácteos Capilla del Señor (Villa María, provincia de Córdoba) a fin de determinar los puntos críticos del proceso para la elaboración de queso a escala industrial.

Parte experimental 2

De acuerdo a las formulaciones obtenidas en la etapa 1, se elaborarán quesos a escala piloto (50 a 200 litros) en la planta de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (EEA-Rafaela), Rafaela, provincia de Santa Fe. En el queso correspondiente se evaluó la recuperación de compuestos funcionales, el perfil de vitaminas antioxidantes y la vida útil. Se realizarán ensayos de almacenamiento y de determinación de marcadores de oxidación (VP y TBARS).

Se continuó con la realización de visitas a la planta industrial de lácteos CDS-Lácteos Capilla del Señor a fin de confirmar los puntos críticos del proceso de incorporación de compuestos funcionales y se realizaron las correcciones pertinentes.

Parte experimental 3

Escalado del proceso a tina quesera de 5000 litros en la planta industrial de CDS-Lácteos Capilla del Señor. Una vez obtenido el queso se evaluará la recuperación de compuestos funcionales, el perfil de vitaminas antioxidantes y la vida útil en el queso correspondiente, se realizarán ensayos de almacenamiento y se estudiará la aparición de marcadores de oxidación (VP y TBARS). Cabe destacar que se realizaron varias elaboraciones con el fin de obtener resultados estadísticamente representativos, llevando a cabo, además, el control de todas las elaboraciones del producto funcional.

4. Materiales y métodos

4.1. Encuesta de consumidores

Se realizaron 141 encuestas de “aceptación de producto” con consumidores utilizando la línea de quesos *light* de la empresa “CDS-Lácteos Capilla del Señor” S.A. Los quesos elegidos fueron el “Por Salut *light*” y “mozzarella *light*” de la línea “LacNat®”. Entre estos dos tipos de quesos estaría el que va a ser enriquecido con fitoesteroles. El lugar en el que se realizó la encuesta fue la carpeta de “Innovación a Futuro” de la exposición “INTA Expone Región NOA”, desarrollada durante el año 2012 en la estación experimental agropecuaria del INTA en la localidad de Cerrillos, provincia de Salta (Argentina). Las encuestas fueron diseñadas con la colaboración de los investigadores del área de Análisis Físicos y Sensoriales del Instituto de Tecnología de Alimentos del INTA Castelar (Morón, provincia de Buenos Aires, Argentina). En estas encuestas de preferencia de consumidores se computaron primeramente las respuestas a los siguientes puntos:

Sexo, Rango etario (20-30; 31-40; 41-50, más de 51), Nivel de estudios.

La segunda parte de la encuesta evaluaba los dos tipos de queso por separado, específicamente el sabor y la textura, utilizando para ello una escala de cinco puntos que iba del “Me disgusta mucho” al “Me gusta mucho”.

Finalmente, en la tercera parte de la encuesta se realizaron cuatro preguntas generales para responder por SI, NO o NS/NC (no sabe/no contesta):

¿Consume quesos habitualmente?

¿Usted es el encargado de realizar las compras en su hogar?

¿Compraría el tipo de queso degustado?

¿Consumiría este tipo de queso para contribuir a mejorar su salud?

4.2. Descripción de la planta “CDS-Lácteos Capilla del Señor”

La empresa “CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A.” es una empresa láctea que se encuentra ubicada en la provincia de Córdoba, más precisamente en la ciudad de Villa María (32°26'36.9"S 63°11'25.3"W) (Fig. 25). Esta empresa procesa 50000 litros de leche por día, con una capacidad máxima de 90000 litros/día, siendo su especialidad los quesos de pasta blanda. Cuentan para ello con un departamento de producción primaria que se ocupa del desarrollo de los tambos, lo cual permite asegurar el abastecimiento de leche en la calidad y cantidad requeridas. Se trata de una planta moderna que cumple con todos los requisitos de la norma ISO 9001:2015 y que cuenta con personal calificado y con experiencia en la elaboración de quesos. Posee un sistema de trazabilidad informático para cada uno de los productos y de un sistema de envasado de quesos fraccionados en porciones. Cuenta con un departamento de control de calidad para asegurar la inocuidad del producto, un departamento de *marketing* que detecta las necesidades de los mercados nacional e internacional y promociona los productos ya existentes, y un departamento comercial que abastece al mercado directamente por medio de tres canales de distribución especializados. Los productos especiales *Premium* (LacNat®) son comercializados en porciones y en hormas (Lombarde®) y

Pionero®). También abastece al mercado a través de distribuidores ubicados no solamente en la provincia de Córdoba sino además en varias provincias a lo largo del territorio nacional. Cuenta con una administración de ventas preparada para la facturación de la distribución y para cubrir las necesidades para llevar a cabo toda la operatoria administrativa. Además, posee un canal de ventas *online* (quesosonline.com.ar) en el que promociona y vende sus productos, directamente del productor al público.

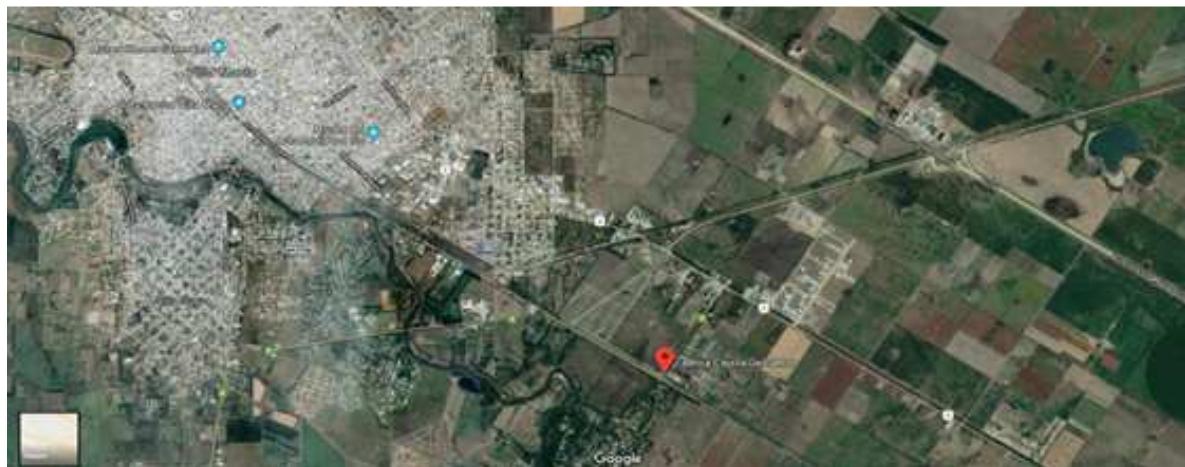


Figura 25. Ubicación de la planta industrial CDS-Lácteos Capilla del Señor (Fuente: Google maps).

En la actualidad, la capacidad de la planta para la recepción de leche es de 150.000 litros, cuenta con dos tinas queseras doble “0” de 5000 litros, con forma de “ocho”, cada una con lira, una pre-prensa automática para quesos y dos desueradoras para la acidificación de la masa para mozzarella. Además, cuenta con una filadora y moldeadora de mozzarella de 1000 kg/hora, dos piletones para la salmuera de 17000 litros de capacidad y un sector de envasado con una máquina envasadora Cryovac ® modelo 8620. A modo de ejemplo se muestran en la **Figura 26** algunos equipos de la industria quesera.

Los efluentes son tratados en una planta de tratamiento que cumple con las regulaciones de la Secretaría de Medio Ambiente de la Provincia de Córdoba.

En lo que respecta al mercado nacional, llega con marca propia o marcas blancas a distintos supermercados como Dia, Carrefour, Walmart (productos especiales *Premium LacNat®* en porciones o *Premium Lombarde®* en hormas especiales) y utiliza la marca El Pionero® para la colocación de excedentes de producción de primavera-verano.

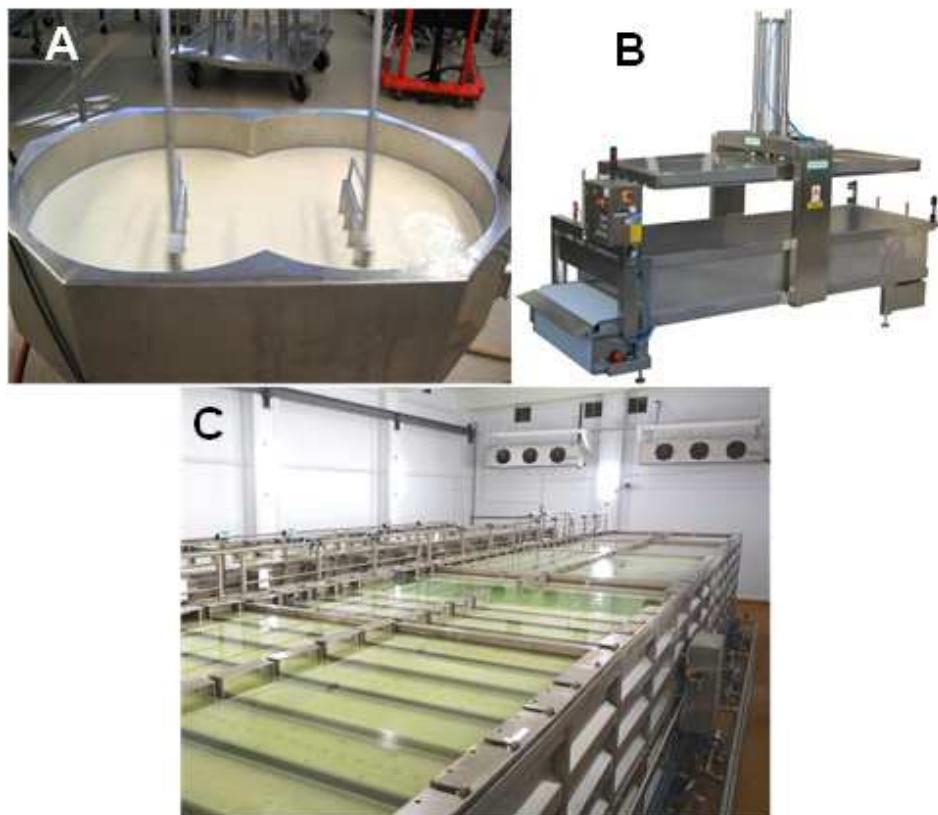


Figura 26. Tina quesera doble “0” con lira (A). Pre-presa automática (B). Saladero de estanterías (C), el cual permite el salado de cada conjunto de estantes en balsas independientes y donde el movimiento de las estanterías se realiza por puente grúa.

4.3. Componentes utilizados en las elaboraciones a las diferentes escalas

- *Fermento (starter culture):* Bacterias lácticas (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, CHR Chr. Hansen, Argentina) liofilizadas de inoculación directa como cultivo starters. Cultivo mezcla de termófilos definidos con resistencia mejorada a fagos de *Streptococcus thermophilus*, para uso en la industria alimentaria (CHR Chr. Hansen, Argentina). Presentación: Sobre por 72,8 g. Cantidad: 1/4 de sobre de STI (06,07,08), actividad: 500 u.
- *Coagulante (rennet, cuajo):*

Elaboraciones laboratorio y piloto: Preparado enzimático líquido a base de proteasa, Marca: ULTRA PLUS 700 IMCU (*International Milk-Clotting Units*) por gramo (Quimosina 100% poder coagulante (700 IMCU/g). Quimosina 100% pura (Origen: Argentina; El Maestro Quesero S.A.).

Elaboraciones industriales: Preparado enzimático líquido a base de proteasa, Marca: PROMAX 750, poder coagulante ≥ 600 IMCU/g). Quimosina 100% pura (Origen: Argentina; ARTIMEC S.A.).

- *Cloruro de calcio:* en solución al 32 % (Alpha Química S.A.I.C.G., Argentina).
- *Cloruro de sodio:* comercial, sal gruesa lavada, centrifugada y seca, pureza ≥ 99 (La Aurora S.A.I.C.G., Argentina).

➤ *Fitoesteroles:*

- i) Fitoesteroles libres (FEL) Advasterol 90®
- ii) Fitoesteroles emulsificados (FEEM) Emulfit AE 3675®.
- iii) Fitoesteroles esterificados (FEE) Advasterol éster ®, con no menos de 970 mg de fitoesteroles totales por gramo.

➤ *Tocoferoles:* VITAMINA E NATURAL SF900 UI ® (AOM S.A.). Tocoferoles naturales de aceite de girasol. Contiene no menos de 604 mg/g de D- α -tocoferol que representan 900 Unidades Internacionales (UI). Contenido de tocoferoles totales de 66-69 %.

4.4. Descripción de la elaboración del queso “Por Salut” *light* (según protocolo Lácteos CDS-Capilla del Señor)

Fue necesario conocer el protocolo de elaboración de los quesos “Por Salut” *light* para determinar los puntos críticos de la adición de los compuestos funcionales en el queso que fue previamente seleccionado a través de la encuesta de consumidores, a fin de no generar cambios a nivel industrial que pudieran impactar negativamente en el producto o proceso. Es por ello que se realizó el relevamiento y el estudio del proceso de fabricación del queso “Por Salut” *light* en la planta industrial, estudiando no solamente las etapas del proceso, sino también a las temperaturas y tiempos empleados durante la elaboración. En la **Figura 27** se presenta el diagrama de flujo que esquematiza el proceso. Así, la elaboración del queso “Por Salut” *light* consta de los siguientes pasos:

1- *Llenado de tanque con leche cruda procedente del silo refrigerado:* la leche entra en el tanque pulmón (1) a 4°C (**Fig. 27**). De allí, pasa por la primera etapa de sección 4 del intercambiador de calor de placas. En esta primera etapa, la temperatura de la leche aumenta hasta unos 40°C con la finalidad de “termizar” la leche, predisponiendo mejor a los glóbulos de grasa, proteínas y demás componentes de la leche a los posteriores tratamientos mecánicos y térmicos. Durante esta etapa, en el punto 3 (**Fig. 27**) se toma una alícuota de 100 mL para realizar la caracterización de la materia prima mediante el equipo Ekomilk ® (EON TRADING INC, Bulgaria), el cual proporciona los datos de materia grasa, sólidos no grasos, densidad, proteína y agua agregada.

2- *Desnatado:* La desnatadora entrega leche con un porcentaje reducido en grasa, del 0,65-0,7 % (p/v). En base a esto y a la información de grasa de la leche cruda brindada por el equipo Ekomilk®, se calcula la relación grasa/proteína que debe tener la leche en la tina para lograr el porcentaje de grasa adecuado en el producto final. Esto nos definirá el volumen de leche que se debe desnatar al 0,9% (p/v) de grasa para que, al mezclarlo con la leche entera (con el valor de grasa determinado por el Ekomilk), el volumen final de leche en la tina quesera contenga un porcentaje de grasa de alrededor del 1,9% (p/v).

3- *Finalización del desnatado:* Una vez finalizado el llenado de la tina con la cantidad de leche descremada (0,9% p/v) hallada por cálculo, se cierra manualmente la válvula V1 en la parte superior

de la desnatadora (**Fig. 27**). La leche entera entra en la desnatadora y, por fuerza centrífuga, la grasa de la leche, más liviana, se separa, dirigiéndose hacia el centro de la desnatadora, siendo extraída por una tubería en la parte superior de ella. A su vez, los sólidos más pesados (pelos, tierra, insectos, etc.) se dirigen hacia la pared externa de la desnatadora, constituyendo los llamados “lodos” que al final del día son descartados durante el desarme e higienizado completo de la desnatadora.

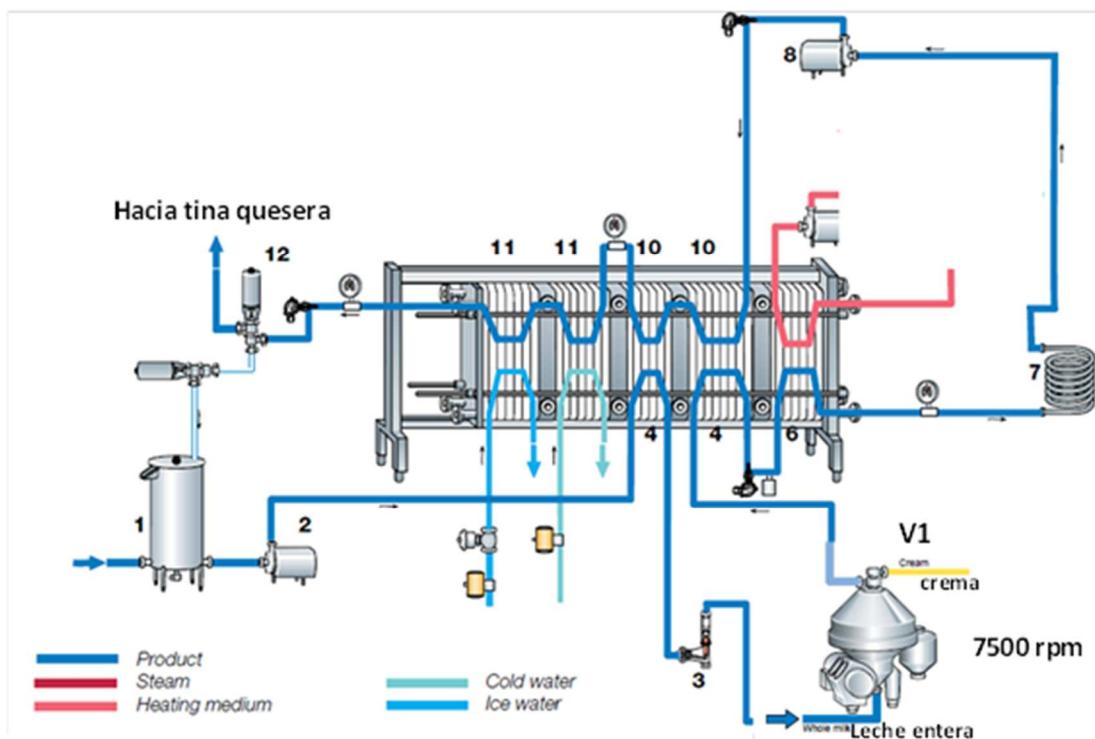


Figura 27. Descripción del proceso de tratamiento de la leche que será destinada a la elaboración del queso (adaptado de *Dairy Processing Handbook*, 1995).

4- *Pasteurización*: Al finalizar el cierre de la válvula **V1**, la leche entera pasa directamente a la segunda sección del pasteurizador donde alcanza nuevamente la temperatura de 40°C, para luego pasar al punto **6** del intercambiador de placas, en donde se eleva la temperatura de la leche a 78°C y se la mantiene durante 15 segundos en el tubo de retención **7**, constituyendo la pasteurización propiamente dicha de la leche (**Fig. 27**).

5- *Llenado de la tina quesera*: se mide nuevamente una alícuota de la leche de la tina en el equipo Ekomilk® para corroborar que la grasa se encuentre dentro de los parámetros establecidos para fabricar el tipo de queso deseado. El maestro quesero adiciona directamente en la tina el cloruro de calcio y el fermento (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (**Fig. 28**).

6- *Cuajada*: El paso siguiente es adicionar el cuajo o coagulante, luego se agita durante 30 segundos para homogeneizar y se deja reposar a 37°C durante 10 – 12 minutos. Pasado este tiempo, el maestro quesero evalúa la cuajada (**Fig. 28**). Cuando las condiciones son óptimas, se realiza su corte, empleando las liras, mientras que, a su vez, se eleva la temperatura hasta unos **40±1°C** para “deshidratar” los gránulos de la cuajada. Esto es determinante para alcanzar la humedad final óptima

y depende de qué tipo de queso se elabore. El punto final de la deshidratación o cocción de la cuajada, así como el tamaño del gránulo, lo determina el maestro quesero (**Fig. 28**).

7- *Vaciado de la tina quesera y moldeado*: Una vez que las características son alcanzadas, se realiza la apertura de la válvula inferior de la tina, lo cual produce la bajada de la cuajada y del suero a la mesa de moldeo, donde hay dispuestos moldes perforados en los cuales la masa se dispone por su propia gravedad, comenzando a producirse el desueroado (**Fig. 28**).

8- *Ajuste del pH*: Luego, los moldes con la masa son retirados de la mesa de moldeo, son colocados en carretones y trasladados a la sala de ajuste del pH, en donde son mantenidos a 40°C durante un determinado tiempo, logrando la acidificación óptima dada por el desarrollo del estárter o fermento. El descenso del pH es controlado cada 30 minutos para que la velocidad de acidificación sea la adecuada, logrando un producto de calidad.

9- *Salado* (**Fig. 28**): Una vez alcanzado el valor de pH deseado, se retira la masa de los moldes y se la coloca cada una en cajones apropiados para pasar a la siguiente etapa, que es la inmersión de las masas mencionadas en salmuera, utilizándose para tal fin un equipo similar al de la **Figura 26C**, cuya concentración es 20 ± 0.5 °B a una temperatura de 4 a 8 °C. Los quesos son sumergidos durante una hora persiguiendo dos objetivos. El primero de ellos es el de producir el salado del producto y, en segundo lugar, el enfriamiento de los quesos, deteniendo la fermentación y así finalizando el descenso del pH.

10- *Corte en porciones y envasado*: Transcurrido ese tiempo, se retiran los quesos de la salmuera y se los dispone en la sala de refrigeración durante 48 horas para luego fraccionarlos y envasarlos en bolsas plásticas (**Fig. 28**).

11- *Madurado en cámara*: Los quesos se fraccionan en porciones de 500 g aproximadamente, se embolsan individualmente al vacío en bolsas plásticas temocontraíbles (CRYOVAC ®) de 58 micrones de espesor, se colocan en cajas de cartón corrugado y se almacenan en cámara de refrigerado a una temperatura de 4 ± 2 °C y una humedad relativa ambiente del 80%. Para quesos de pasta blanda, el tiempo de madurado en cámara es de 21 días (protocolo CDS S.A.), tiempo en el cual se producen distintas reacciones que fueron descriptas oportunamente en la “Introducción”, las cuales les otorga a los quesos características sensoriales y texturales particulares. Luego de esos 21 días, los quesos se encuentran en condiciones óptimas para ser distribuidos y consumidos supuestamente dentro de los 60 días a partir de la fecha de elaboración. A los fines de la presente tesis, los ensayos se extendieron por un plazo de 90 días, comprendidos desde la fecha de elaboración hasta la de vencimiento, período que se denominó “tiempo de vida útil”.

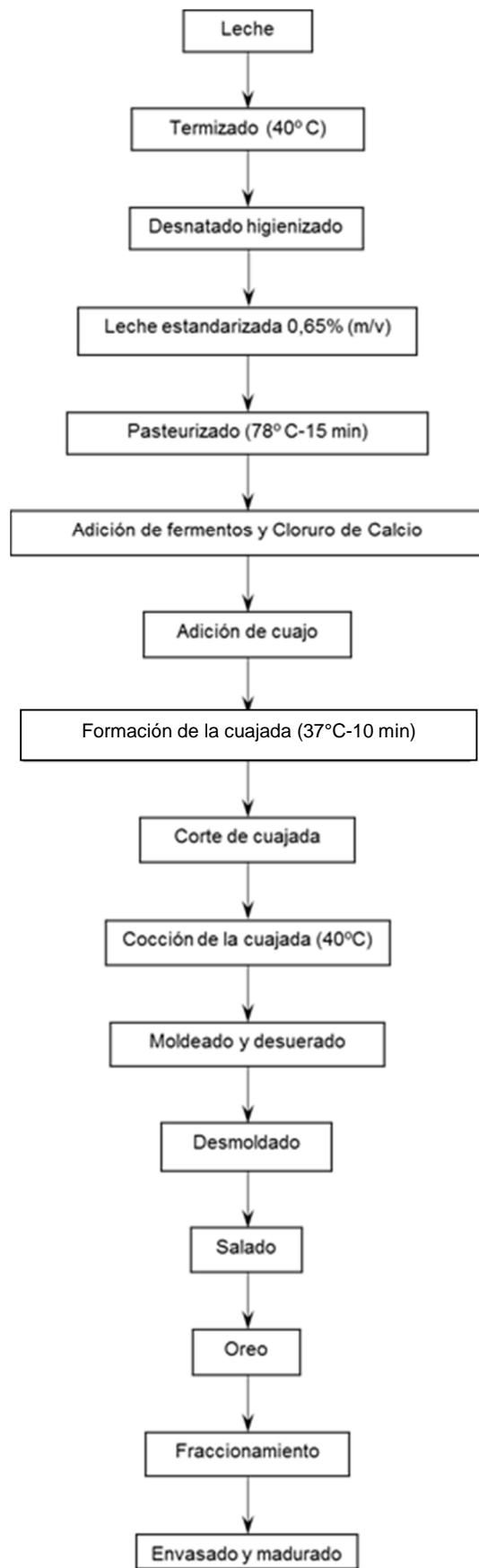


Figura 28. Diagrama de proceso para la elaboración de quesos *light*. Temperatura y tiempo de cada etapa. Protocolo de la empresa CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A. (Villa María, Córdoba).

4.5. Composición química. Determinaciones a nivel laboratorio, piloto e industrial

En su Capítulo VIII, artículo 625, el Código Alimentario Argentino define queso Por Salut: "Con la denominación de Queso "Por Salut" o Queso "Saint Paulin", se entiende el producto de alta humedad, graso, elaborado con leche entera o leche estandarizada, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas.

Deberá cumplir con las siguientes exigencias:

- a. Masa: semi-cocida, moldeada, prensada, salada y madurada.
- b. Pasta: blanda, consistencia elástica; sabor dulce; aroma acentuado típico; color blanco-amarillento o débilmente rojizo.
- c. Corteza: lisa, bien formada, resistente.
- d. Forma: cilíndrica achatada o paralelepípeda.
- e. Tiempo de maduración: mín. 20 días.
- f. Peso: máx. 4 kg.
- g. El rotulado deberá efectuarse en conformidad con las exigencias establecidas en el presente Código. Este producto se rotulará indistintamente: "Queso Por Salut" o "Queso Saint Paulin".

En lo que respecta a las determinaciones realizadas tanto sea en la planta piloto de la EEA-Rafaela (elaboraciones a escala laboratorio y piloto) como en la planta industrial CDS, rutinariamente se realizan análisis y determinaciones, tanto a la materia prima como así también para el seguimiento de todas las etapas de elaboración hasta obtener el producto final. A continuación, en las **Tablas 11, 12 y 13** se muestra un detalle de los análisis a los que se somete a los productos obtenidos en cada etapa.

Tabla 11. Análisis de la leche cruda estandarizada y del suero.

Leche cruda estandarizada		
Análisis	Criterios de Calidad	Método de Análisis
Temperatura	2 - 8 °C	Medición con termómetro
Punto de congelación	< -0.512	Ekomilk - Ultrasonido
% Aguado	0	Ekomilk - Ultrasonido
Acidez	14 - 16 ,5°D	Volumetría
pH	6.7 – 6.9	Potenciometría
% de Materia Grasa	Mín 2,8	Ekomilk - Ultrasonido
% de Proteínas	Mín 2,8	Ekomilk - Ultrasonido
Prueba de Alcohol	No debe cortar	Prueba con alcohol al 75%
Inhibidores	Negativo	Test Cualitativo
Suero		
Análisis	Criterios de Calidad	Método de Análisis
% de Materia Grasa		Ekomilk - Ultrasonido

En lo que respecta al análisis de la coagulación y cuajada: determinación del punto inicial de la coagulación con coagulómetro INRA-Pignat ®, mientras que la determinación del punto final de la coagulación es cualitativa, a cargo del técnico en elaboraciones a escala laboratorio y piloto en EEA-Rafaela.

Para las elaboraciones industriales en la planta CDS Lácteos Capilla del Señor, la determinación del punto inicial y final de la coagulación es cualitativa y queda a criterio del maestro quesero.

Tabla 12. Análisis del queso.

Queso		
Análisis	Método	Método de Análisis
Almidón	Analítico	CASADO CIMIANO
Cenizas (g/100g)	Gravimétrico	FIL 27:1964
Cloruros (g ClNa/100g)	Argentométrico Volhard Charpenter	FIL 17A:1972
Humedad (g/100g)	Gravimétrico (Cálculo por diferencia)	ISO 5534:2004 (IDF4:2004)
Materia grasa (g/100g)	Gravimétrico	ISO 1735/FIL 5:2004
pH (19°C)	Potenciométrico	
Determinación del contenido de nitrógeno en leche y productos lácteos. Parte 1: Principio de Kjeldhal y Cálculo de proteína a cruda (g/100g)	Kjeldhal	ISO 8968-1:2014 (IDF 20- 1:2014)
Sodio (mg/100g)	Electrodo ión selectivo	Manual del fabricante
Calcio (mg/100g)	Complejométrico	APHA-AWWA-3500CA D-

Tabla 13. Análisis de la salmuera.

Salmuera		
Análisis	Método	Método de Análisis
pH (19°C)	Potenciométrico	

Cámaras:

- Determinación de la Humedad del aire ambiente. (Higrómetro calibrado)
- Determinación de temperatura. (Termómetro digital calibrado).

4.6. Ensayos de desempeño de fitoesteroles (FE)

Una vez realizada la elección del tipo de queso a enriquecer y el relevamiento del proceso de elaboración, se efectuaron las pruebas de desempeño a nivel laboratorio de los FE en sus distintas presentaciones disponibles en el mercado.

Se realizaron pruebas con los siguientes productos previamente mencionados:

- Emulfit AE 3675® (Saporiti S.A.): fitoesteroles emulsificados (FEEM) conteniendo los estabilizantes INS-1450 y INS-473.
- Advasterol ester ® (AOM S.A.): fitoesteroles esterificados (FEE) con ácidos grasos de colza (*Brassica napus*).
- Advasterol 90® (AOM S.A.): fitoesteroles libres (FEL).

4.7. Estrategias para la incorporación de fitoesteroles esterificados (FEE)

Como se observó en el punto anterior existen distintas presentaciones de FE en el mercado (libres, emulsificados o esterificados) que los hacen aptos en mayor o menor medida para lograr un mejor desempeño en distintas matrices, esto es, matrices mayoritariamente acuosas o, por el contrario, matrices grasas. Del relevamiento del proceso de elaboración se detectaron no solamente puntos críticos de adición sino que, además, se podía trabajar con leche entera (3,7% p/v), leche estandarizada descremada al 0,9% p/v o bien crema de leche (48% p/p), todas ellas a diferentes temperaturas. Cabe aclarar que las pruebas de desempeño se realizaron en el ITA-INTA (Castelar) con leche provista por la empresa CDS-Lácteos Capilla del Señor. Es por ello que surgen diferentes estrategias de incorporación de los compuestos bioactivos, las cuales consistieron en:

- Adicionar los FEE (previamente termostatizados a 40°C) en leche entera cruda de silo en el tanque pulmón.
- Adicionar los FEE a leche estandarizada (1,9% p/v) destinada a la elaboración del queso, directamente en la tina quesera (previamente termostatizados a 40°C), mezclarlos con la ayuda del lirado y, luego, adicionar el cuajo para continuar con el proceso habitual.
- Desnatar la leche hasta 1,9% p/v y adicionarle posteriormente los FEE justo antes de la pasteurización, para luego continuar con el proceso habitual.
- Adicionar los FEE (previamente termostatizados a 40°C) a un volumen de crema de leche proveniente de la desnatadora (48% p/p de contenido graso) y, una vez lograda la homogeneidad, verter en el tanque pulmón antes del proceso de pasteurización (**Fig. 27**).

Si bien cabe destacar que estas pruebas de desempeño son cualitativas, se trabajó estandarizando variables como temperatura (40°C), velocidad de adición, velocidad de mezclado y volúmenes de matriz a adicionar. Un punto importante a destacar es que todos estos productos son de grado alimenticio y son entregados por el proveedor con sus respectivas hojas de seguridad, hojas de análisis y certificados correspondientes al lote de producción.

4.7.1. Adición de fitoesteroles Emulfit AE 3675® (FEEM)

Este producto contiene en su composición estabilizantes codificados según el *INTERNATIONAL NUMBERING SYSTEM* como INS-1450 (succinato de octenilo, de almidón de maíz modificado) e INS-473 (ésteres de ácidos grasos con sacarosa u oligoésteres de sacarosa).

A temperatura ambiente, el Emulfit AE 3675® (sección 4.3) es un polvo blanco o ligeramente amarillento, fácilmente dispersable y recomendado para adicionar a matrices acuosas, aunque también se puede agregar a matrices grasas. Una vez pesada la cantidad de Emulfit AE 3675®, volúmenes de 100 mL de leche entera, leche estandarizada y de crema de leche contenidos en diferentes Erlenmeyers fueron termostatizados a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño de agua (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina). A continuación, se procede a realizar el agregado del Emulfit AE 3675®, gradualmente y agitando con varilla de vidrio. Los parámetros a evaluar luego de la adición fueron la homogeneidad, la formación de gránulos o grumos, el cambio de color, la integridad y aspecto general de la mezcla.

4.7.2. Adición de fitoesteroles esterificados Advasterol Ester® (FEE)

Este producto contiene en su composición FEE con ácidos grasos de colza (*Brassica napus*). A temperatura ambiente es una pasta semisólida de color blanco amarillento con un ligero aroma característico a aceite vegetal. A temperatura de ensayo, $40 \pm 1^\circ\text{C}$, esta grasa funde y se convierte en un aceite amarillo con el aroma antes descrito. Se obtiene por esterificación de esteroles vegetales libres obtenidos de la soja (*Glycine max*) con ácidos grasos del aceite vegetal de colza (*Brassica napus*). Esta presentación, por su alta hidrofobicidad es recomendada para adicionar a matrices principalmente grasas.

Una vez pesada la cantidad de Advasterol ester®, se la equilibra a temperatura constante. Volúmenes de 100 mL de leche entera, leche estandarizada y de crema de leche, contenidos en diferentes Erlenmeyers, se equilibran a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño termostatizado (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina). Finalmente, se procede a realizar el agregado del Advasterol ester®, gradualmente mientras se agita con varilla de vidrio. Los parámetros a evaluar luego de la adición fueron la homogeneidad, la formación de gránulos o grumos, el cambio de color, la integridad y el aspecto general de la mezcla.

4.7.3. Adición de fitoesteroles libres (FEL) Advasterol 90®

Este producto contiene en su composición FEL. A temperatura ambiente es un polvo blanco con una granulometría considerable y un ligero aroma característico a aceite vegetal. A la temperatura de ensayo, $40 \pm 1^\circ\text{C}$, se mantienen intactos. Se obtiene de distintos aceites vegetales, pero fundamentalmente del de soja. Este polvo es bastante insoluble en agua, aceites y grasas, siendo recomendado para utilizar en productos secos (alimentos farináceos principalmente). De todos modos, se estudió su desempeño en la matriz láctea debido a la gran ventaja de que, en esta presentación, los FE están libres, teniendo que agregar directamente la cantidad proporcional en el

volumen total de leche para lograr la concentración respectiva buscada en el producto final, a diferencia de las otras dos presentaciones en las que debemos agregar mayor cantidad por estar los FEE acompañados de otros compuestos: por ácidos grasos para el caso de los FEE y por INS-1450 e INS-473 en el caso de los FEEM, como se mencionó oportunamente en la sección 4.6.

Para estos ensayos, volúmenes de 100 mL de leche entera, leche estandarizada y crema de leche contenidos en diferentes Erlenmeyers, se templaron a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño termostatizado (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina). Finalmente, se procede a agregar Advasterol 90® gradualmente y agitando con varilla de vidrio. Los parámetros a evaluar luego de la adición fueron la homogeneidad, la formación de gránulos o grumos, el cambio de color, la integridad y aspecto general de la mezcla.

4.7.4. Adición de los tocoferoles como aditivo antioxidante

La VITAMINA E NATURAL SF900 UI ® (sección 4.3) es un líquido viscoso a temperatura ambiente de color ámbar rojizo. Posee un suave olor y sabor característico a aceite vegetal. El preparado garantiza 900 UI de D-alfa tocoferol. De todos modos, se realizó la caracterización química correspondiente. Cuando se realizaron las producciones a escala industrial, la VITAMINA E NATURAL SF 900 UI® fue pesada y adicionada a los FEE arriba mencionados, directamente en el recipiente que contiene a estos últimos. Los compuestos se equilibraron a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$, agitando suavemente con una varilla de acero inoxidable y, una vez lograda la homogeneidad y completa la fusión de los compuestos bioactivos, fueron adicionados al tanque pulmón 1 (**Fig. 27**), tal como se realizó en las elaboraciones anteriores.

4.8. Elaboraciones a escala laboratorio (1 litro de leche) de queso Por Salut *light* con adición de FEE (Advasterol Ester®) a diferentes niveles

Los quesos se elaboraron en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA de Rafaela (provincia de Santa Fe, Argentina), en el área de Procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria (**Fig. 29**), siguiendo el protocolo de la planta industrial CDS-Lácteos Capilla del Señor.

El objetivo fue elaborar un queso descremado tipo “Por Salut” a escala laboratorio (100 g), probando la forma de incorporación en leche o en crema y analizar el contenido de los FEE (Advasterol ester®) en la matriz. Un punto importante a mencionar es que se planteó adicionar un 25 y un 50 % más de los FEE para evaluar el desempeño, tal como se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Formulaciones de trabajo de fitoesteroles esterificados, FEE (Advasterol ester®), agregados a la leche (FEEL) o a la crema (FEEC).

Lote	Quesos elaborados
C	Control: queso sin adición de FEE
3,67 FEEL	Queso adicionado con FEE incorporados en leche (Proporción: 3,67 g/100 mL leche)
3,67 FEEC	Queso adicionado con FEE incorporados en crema (Proporción: 3,67 g/100 g crema)
4,60 FEEL	Queso adicionado con FEE incorporados en leche (Proporción: 4,60 g/100 g leche)
4,60 FEEC	Queso adicionado con FEE incorporados en crema (Proporción: 4,60 g/100 g crema)
5,50 FEEL	Queso adicionado con FEE incorporados en leche (Proporción: 5,50 g/100 g leche)
5,50 FEEC	Queso adicionado con FEE incorporados en crema (Proporción: 4,60 g/100 g crema)

Las elaboraciones se realizaron por triplicado ($n=3$) en días diferentes para aleatorizar posibles variables. Brevemente, se utilizó leche del Tambo Experimental del INTA EEA de Rafaela (Santa Fe). Una vez recibida se le controló la temperatura (4-10°C), se la descargó en la tina quesera doble “0” con lira de 180 L (**Figura 26A**), se la homogeneizó y se tomó una muestra para analizar el pH y la acidez. Luego, la leche fue pasteurizada (63°C; 30 min) directamente en la tina quesera con agitación constante. Esa decisión fue tomada debido a que los pequeños volúmenes de leche utilizados no permitían emplear el pasteurizador de placas REDA®. Una vez pasteurizada, la leche es enfriada hasta los 46°C, siendo luego una parte estandarizada por medio de una desnatadora ELECREM® (**Fig. 29**) de modo de obtener un valor de materia grasa final de 1,8-1,9% en aquella leche destinada a la elaboración de quesos controles y de quesos adicionados con FE mezclados en leche, y de 1% en aquella leche destinada a la elaboración de quesos adicionados con FE mezclados en la crema. Para estos últimos, una vez que se adicionaron los FEE mezclados en la crema, la concentración de grasa en la leche fue de 1,9 % p/v. Luego se enfrió y almacenó en cámara a 4°C hasta su uso. En vasos de precipitado de vidrio, se tomaron partes de 1L de leche, se temostatizaron a las temperaturas adecuadas en bañomaria (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina) de acuerdo a los protocolos de trabajo y se adicionaron luego los fermentos *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Streptococcus thermophilus* (CHR Chr. Hansen, Argentina), el coagulante y el cloruro de calcio en solución al 32% esterilizada (sección 4.3). Con la ayuda de un coagulómetro (INRA-Pignat) se determinó el tiempo de inicio de la cuajada. Una vez transcurrido el tiempo establecido por

protocolo, se evalúa la cuajada y se realiza su corte con cuchilla manual tratando de mantener el tamaño del gránulo de cuajada de acuerdo al tipo de queso, a la vez que la temperatura se eleva a 40°C para cocinar la masa durante 2 minutos. La masa es colocada en moldes pequeños perforados para que se produzca el desuero, incubándose los quesos a $38\pm1^{\circ}\text{C}$ para que descienda el pH a valores de 5,2, monitoreándolo cada 30 minutos durante el lapso de 3 hs 30 min a 4 hs. Luego los quesos son llevados a una batea de polipropileno con salmuera (20° Be ; pH 5; 4°C), se los retira y se los mantiene en oreo en cámara refrigerada ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) durante 24 hs, para luego envasarlos al vacío en bolsas de alta densidad termocontraíbles (CRYOVAC ®) de 58 micrones de espesor.



Figura 29. Tina quesera a escala planta piloto (180L) (EEA-Rafaela, provincia de Santa Fe) (A). Módulo tanque para la recepción de la leche, desnatadora ELECREM ® y pasteurizador de placas REDA ® (B).

4.9. Elaboraciones a escala piloto (tina 180 litros) de queso Por Salut *light* con adición de FEE (Advasterol Ester®)

El objetivo que persiguió la elaboración fue determinar la forma de incorporación de los FEE, esto es, en crema o directamente en leche, y evaluar la recuperación de los FE y TF de los quesos "Por Salut" *light* producidos a escala piloto, con una dosis ajustada según la recuperación obtenida en la primera elaboración a escala piloto. La formulación empleada para la elaboración a escala piloto es la que se reporta en la **Tabla 15**. Para este caso se utilizó un equipo pasteurizador a placas REDA® (Italia) de 300 L/h (**Fig. 29B**), similar al que posee la planta industrial. La adición de los FEE pre-incorporados en leche o en crema se realizó en un tanque pulmón ubicado a la salida de la desnatadora, previo al proceso de pasteurización (**Fig. 29B**), para luego dirigirse a la tina quesera en donde se realizó normalmente el resto del proceso de elaboración.

Tabla 15. Formulación empleada en la elaboración del queso Por Salut *light* a escala piloto¹, empleando fitoesteroles esterificados (FEE) agregados en la leche (FEEL) o en la crema (FEEC). C: control sin fitoesteroles.

Componente	C	FEEL	FEEC
Leche 1,9% (litros)	180	180	180
CaCl ₂ (g) ¹	18	18	18
Fermento (g) ¹	3,24	3,24	3,24
Coagulante (mL) ¹	162	162	162
FEE ²	No	1386 g/2,74 L leche	1386 g/2,74 L crema

¹Ver sección 4.3.

Como se mencionó en los párrafos anteriores se empleó el pasteurizador de placas el cual permite que la temperatura de pasteurización sea la que se emplea en la planta industrial para la elaboración de quesos blandos (80°C ± 1) y, de esta manera, trabajar con una dinámica mucho más industrial. La instalación de dicho equipo permite que una vez pasteurizada la leche, con o sin los FEE, se traslade y descargue (por medio de tuberías de acero inoxidable calidad alimentaria) directamente en la tina quesera para llevar adelante la elaboración de los quesos. Una vez que la leche se encontraba en la tina, se le adicionaron los fermentos *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Streptococcus thermophilus* (CHR Chr. Hansen, Argentina), el coagulante y el cloruro de calcio en solución al 32% esterilizada (sección 4.3). Con ayuda de un coagulómetro (INRA-Pignat) se determinó el tiempo de inicio de la cuajada. Los pasos de corte y cocción de la cuajada, desuerado, incubación, monitoreo del pH, salado, oreo y posterior envasado, son exactamente iguales a los descriptos en la elaboración a escala laboratorio (Sección 4.8).

4.10. Elaboraciones a escala industrial (tina 5000 litros) de queso Por Salut *light* con adición de FEE (Advasterol Ester®) y de tocoferoles

Con la experiencia y el desempeño evaluado en las elaboraciones anteriores y siguiendo con el proceso de escalado, se realizaron cinco (5) elaboraciones a escala industrial en las instalaciones de la planta láctea antes descripta (CDS-Lácteos Capilla del Señor). Cabe destacar que para todas se acordó elaborar a medio volumen de tina (2500 litros) con agregado de FEE (Advasterol Ester®). Se agregó α -tocoferol como aditivo antioxidante natural (sección 4.3). Además, se acordó que cada elaboración del producto funcional iba a estar acompañada con una elaboración de queso Por Salut *light* regular, siendo cada una de estas elaboraciones el control o testigo (C) de la elaboración respectiva (**Tabla 16**). Como se mencionó anteriormente, las producciones se realizaron siguiendo el protocolo de la empresa, pero agregándole el compuesto funcional, tal como se detalla a continuación. Una hora antes de la elaboración se colocó, en una batea calefaccionada con agua a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$, el recipiente de polipropileno de 18 kg que contiene los FEE (Advasterol Ester®) y el α -tocoferol antioxidante. Una vez que se alcanzó la fusión completa, se comenzó el llenado de la tina con leche pasteurizada y el vertido gradual de la mezcla fundida (FEE y TF) en el tanque pulmón 1 (**Fig. 27**). El vertido debe ser gradual, constante y con asistencia de agitación mecánica en el tanque pulmón debido a que la diferencia de temperatura entre la mezcla fundida (40°C) y la leche del silo (4°C) hace que parte de los compuestos bioactivos vuelvan a solidificar y floten por diferencia de densidad, provocando un problema que se soluciona fácilmente con la asistencia de la agitación antes mencionada. Luego de esto, el proceso de fabricación continúa de la manera habitual según el protocolo de fabricación (**Fig. 28**). La formulación empleada para la elaboración a escala industrial es la que se reporta en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Formulación empleada en la elaboración a escala industrial¹.

Componente	C	FEE ¹
Leche 1,9% (litros)	3100	3100
CaCl ₂ (g) ¹	700	700
Fermento (g) ¹	56	56
Coagulante (mL) ^{1,2}	150	150
FEE ¹ (kg)	--	18
Tocoferoles ¹ (900 UI) (g)	--	30

¹Ver sección 4.3.

²Marca: PROMAX 750, poder coagulante (≥ 600 IMCU/g). Quimosina 100% pura.

Una vez que salen de la salmuera (**Fig. 28**: etapa de salado), los quesos pasan a la cámara de envasado en la cual son primero cortados en porciones y envasados luego al vacío en un film impermeable al vapor de agua. El film es de polietileno de alta densidad termocontraíble de 58 micrones de espesor. Para envasar se utilizó una máquina marca CRYOVAC ®, modelo 8600 Series (Sistema de cámaras de vacío rotativas) (País de origen: Noruega).

Las piezas de queso envasadas fueron enseguida transportadas en refrigeración al Instituto de Tecnología de Alimentos (INTA Castelar, provincia de Buenos Aires) para realizarles los análisis correspondientes.

4.10.1. Estudios de almacenamiento

Luego de envasados, los quesos obtenidos a escala industrial fueron estudiados durante el almacenamiento por 90 días a 4°C (± 1) y 80% (± 5) de humedad relativa, realizándoles los siguientes análisis: contenidos de fitoesteroles libres (FEL), de γ y α -tocoferoles, de β -caroteno y de retinol, así como el perfil de ácidos grasos y los ensayos de VP y de TBARS, según las técnicas que a continuación serán detalladas. Además, se evaluó el contenido de humedad de los quesos según lo explicado en la sección 4.5. Cabe señalar que, desde la fecha de elaboración, este tipo de quesos deben ser consumidos dentro de un plazo de 60 días. Una vida útil de 90 días corresponde a un tiempo que se considera extremo y fuera de la vida útil comercial del queso. Este muestreo se realizó para conocer el comportamiento de los parámetros en condiciones extremas o de vida útil extendida.

4.11. Fitoesteroles, tocoferoles y carotenoides: determinaciones analíticas

4.11.1. Extracción de fitoesteroles

La determinación de los FE fue realizada en el “Laboratorio de Vitaminas, Antioxidantes y Compuestos Funcionales” del Instituto de Tecnología de Alimentos (INTA Castelar), siguiendo la técnica descrita por Slavin & Yu (2012) con modificaciones realizadas en el contexto de esta tesis. Una vez realizado el madurado de los quesos, se toman 2 g y se lo dispone en un Erlenmeyer en donde se agregan 98 mL de buffer fosfato de potasio (PK) 0,05M pH 7,7 y se homogeniza durante 2 min con Ultra-Turrax ® (IKA, Alemania). Se atempera a 40° C durante 2 minutos mientras se agita y se toma una alícuota de 1 mL del homogenato, reservándolo en tubo de vidrio. Se agregan 2 mL de 2,6-di-terbutil-4-metil-fenol (BHT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) al 1% en etanol y se incuba 2 minutos en baño termostático (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina) a 70° C con agitación suave. Se retira del baño y se adicionan 1,8 mL de KOH 12N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se vortexea suavemente y se saponifica durante 2 horas a 70° C agitando cada 30 minutos. Pasado ese tiempo, se saca del baño y se enfriá en baño de hielo. Se le adicionan 5 mL de NaCl (Puro Alcor, Argentina) 1M y 10 mL de hexano calidad HPLC (JT BAKER, Holanda). Se vortexea durante 2 minutos y se deja reposar unos minutos hasta que se separen las fases. Se extrae y se reserva en otro tubo de vidrio la fase superior y se repite el lavado con 5 mL de hexano, que se reúnen con lo anterior. Luego se procede a lavar con 5 mL de solución de Na₂CO₃ (Puro Alcor, Argentina) al 5%, separando nuevamente la fase superior y reservándola en tubo de vidrio. Por último, se evapora en atmósfera de nitrógeno y se resuspende en 500 μ L de metanol calidad HPLC (JT BAKER, Holanda).

Esta técnica también fue puesta a punto en la presente tesis para leche y crema de leche. Se toman 3 mL y 0,5 g de leche y crema, respectivamente, y se siguen los mismos pasos descriptos en el párrafo anterior desde el agregado de 2 mL de BHT.

4.11.2. Detección de fitoesteroles libres (FEL)

Esta determinación se puso a punto en la presente tesis. Los fitoesteroles libres se detectaron y cuantificaron por HPLC. Se usó un sistema provisto de un desgasificador de membrana SCM1000 (TSP), una bomba cuaternaria (SpectraSYSTEM P4000, TSP), la columna Phenomenex Luna C8 (50 mm x 4,6 mm, partícula 5 μ), una interface (SN4000, TSP) y el software Chromquest (versión 4.0, ThermoFinnigan, San Jose, USA).

El detector es un equipo Alltech 500 ELSD seteado a una temperatura del tubo de evaporación de 80°C, con un flujo de gas de nitrógeno ultra puro (> 99,999%) a 6,3 SLPM y la atenuación del instrumento se estableció en el nivel 1/32.

La elución de los fitoesteroles se llevó a cabo mediante un gradiente de la fase móvil según lo descripto en la **Tabla 17**, manteniendo un flujo de 1 mL/min. Tanto el agua como el metanol fueron de calidad HPLC.

Tabla 17. Gradiente de la fase móvil empleada para la elución de los fitoesteroles (mL).

Tiempo (min)	Agua : Metanol (98:2)	Metanol
0	20	80
3	80	20
5	8	92
19	8	92
20	20	80

4.11.3. Cuantificación de FEL

La cuantificación de FEL se efectuó mediante curvas de calibración utilizando un estándar externo de concentración conocida, en este caso, de β -sitoesterol, campesterol y stigmasterol (Sigma-Aldrich, St. Lois, USA).

4.11.4. Validación del método para la detección de los fitoesteroles

Mediante la utilización de estándares externos de campesterol, estigmaesterol y β -sitoesterol, se identificaron los picos de acuerdo a sus tiempos de retención, así como también aumentando los valores de las áreas respectivas realizando *spikes*.

4.11.4.1. Linealidad, rango y límite de cuantificación

Las soluciones “madre” se crearon a partir de los estándares comerciales, verificando su concentración mediante la ley de Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$) de acuerdo a los coeficientes de extinción molar (ϵ) enumerados en la **Tabla 18**. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Lambda Bio 20, UK) con cubetas de cuarzo del mismo fabricante.

Tabla 18. Coeficientes de extinción molar (ϵ) de los fitoesteroles estándares.

	Solvente	λ_{max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Referencia
β -Sitoesterol	Etanol	206	4200	Slavin, 2012
Stigmaesterol	Etanol	205	5500	Slavin, 2012
Campesterol	Etanol	206	4200	Slavin, 2012

Una vez valoradas las soluciones “madre”, se construyeron curvas con un mínimo de doce concentraciones en el rango que se especifica en la **Tabla 19**, inyectando por triplicado tres días distintos. Para cada estándar, el valor de concentración más bajo inyectado es, además, el límite de detección.

Tabla 19. Rango de concentración para las curvas de calibración en ELSD.

	Rango de concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Detector
β -Sitoesterol	5-400	ELSD
Estigmaesterol	5-200	ELSD
Campesterol	5-200	ELSD

4.11.4.2. Precisión y repetibilidad

Para evaluar la precisión y la repetibilidad del método analítico y extractivo se utilizaron los FEE de la empresa AOM S.A. (Advasterol ester®) (sección 4.3). Las extracciones se realizaron saponificando las muestras tomando como criterio la variación intramuestras y, además, se realizaron extracciones en diferentes días. Luego se compararon las medias y los desvíos estándar. Cada extracto se inyectó tres veces en el equipo para determinar la precisión del método (variabilidad intramuestra). Se saponificaron tres alícuotas del mismo lote de FEE, inyectándolas el mismo día para determinar la repetibilidad del día (variabilidad intradía), mientras que se realizó durante tres semanas no consecutivas la repetición de la extracción para evaluar la repetibilidad del método (variabilidad interdías).

4.11.4.3. Recuperación

La recuperación del método de extracción se determinó utilizando leche, crema de leche (48 % de grasa) y queso. Cada una de las muestras se realizó por triplicado enriqueciendo con dos niveles de concentraciones, 10 y 25 µg para el campesterol y el estigmaesterol, respectivamente, y 10 y 50 µg para el caso del β-sitoesterol. El cálculo del porcentaje de recuperación se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{Spike_{\text{pre-saponificado}} \text{ (µg)} - Blanco_{\text{Muestra}} \text{ (µg)}}{Spike_{\text{post-saponificado}} \text{ (µg)} - Blanco_{\text{Muestra}} \text{ (µg)}} \times 100$$

Spike pre-saponificado corresponde al enriquecimiento de cada muestra con estándares antes del procedimiento de saponificación, mientras que el *spike* post-saponificado fue enriquecido con estándares después del procedimiento de saponificación. El blanco de muestra, en tanto, corresponde a la cantidad de fitoesteroles detectada en las muestras sin enriquecer.

4.11.5. Extracción simultánea de tocoferoles, β-caroteno y retinol

La determinación simultánea de los isómeros α y γ del tocoferol, así como del β-caroteno y del retinol fue realizada en el “Laboratorio de Vitaminas, Antioxidantes y Compuestos Funcionales” del Instituto de Tecnología de Alimentos (INTA Castelar), siguiendo la técnica descrita por Buttriss y Diplock (1984). Para la determinación de las vitaminas se toman alícuotas de 0,5 g de queso picado ó 0,5 g de crema de leche y se mezclaron separadamente con 1 mL de buffer fosfato de potasio (PK) 0,05M pH 7,7 y con 2 mL de pirogalol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1% en etanol. Se homogeneiza durante 2 min con Ultra-Turrax ® (IKA, Alemania). Se incubaron durante 2 min a 70 °C en baño de agua (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina) con agitación suave y se adicionan 0,3 mL de KOH 12N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se saponifica en baño termostático durante 30 min también a 70 °C con agitación. Se enfriaron en baño de agua con hielo hasta temperatura ambiente y se agregaron 2 mL de agua bidestilada para mejor separación de las fases y 12 mL de hexano calidad HPLC (JT BAKER, Holanda). Se agitaron en vórtex durante 2 min. Luego, se procedió a separar la fase hexano, repitiendo la operación con 5 mL de hexano y reuniendo la segunda extracción con la primera. Por último, se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno para evitar deterioro, se resuspendió el extracto en 500 µL de etanol calidad HPLC y se filtró por membrana de 0,45 µm de porosidad (Buttriss & Diplock, 1984).

Si el producto a extraer es leche fluida, se toman 3 mL, se agregan 2 mL de pirogalol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1% en etanol y se continúa a partir del paso de incubación a 70° durante 2 minutos, realizando la misma técnica descripta en el párrafo anterior.

4.11.6. Detección de tocoferoles, β -caroteno y retinol

Las vitaminas se detectaron y cuantificaron por HPLC (Ultimate 3000 TSP, ThermoFisher Scientific, USA) en la modalidad isocrática, con una fase móvil de etanol/metanol 60:40 (v/v) a un flujo de 1 mL/min, de acuerdo a la técnica del grupo descripta en Rossetti et al. (2015). El equipo cuenta con un desgasificador de membrana, una bomba cuaternaria, un auto sampler, un módulo con horno para termostatizar la columna C18 (Alltima 250 mm x 4,6 mm, partícula 5 μ) y es comandado a través del software Chromeleon (versión 7, ThermoFisher Scientific, USA).

Para el caso del α -tocoferol y γ -tocoferol, retinol y β -caroteno se realizó una dilución de los extractos resuspendidos de los quesos funcionales, mientras que los extractos de los quesos control se inyectaron tal cual, de forma automática, en un volumen de 50 μ L con un loop de 100 μ L.

Se utilizaron dos detectores: el de fluorescencia (Ultimate 3000 marca Thermo Scientific) seteado a 296-330 nm (ex - em) para los tocoferoles y el de arreglo de diodos seteado a 325 nm y 445 nm respectivamente, para el retinol y β -caroteno.

4.11.7. Cuantificación de tocoferoles, β -caroteno y retinol

La cuantificación de estos compuestos se efectuó mediante curvas de calibración y utilizando un estándar externo de concentración conocida (DL- α -tocoferol, Merck-Darmstadt, Alemania; (+)- γ -tocoferol, β -caroteno y retinol, todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Al igual que para el caso de los fitoesteroles, se prepararon soluciones “madre” creadas a partir de los estándares comerciales, verificando su concentración utilizando la ley de Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$) de acuerdo a los coeficientes de extinción molar (ϵ) enumerados en la **Tabla 20**. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Lambda Bio 20, UK) con cubetas de cuarzo del mismo fabricante.

Tabla 20. Coeficientes de extinción molar para distintos analitos.

	Solvente	λ_{max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Referencia
Retinol	Etanol	325	52791	Boulet, 2020
β -Caroteno	THF	456	128790	Boulet, 2020
α -Tocoferol	Etanol	292	3809	Boulet, 2020
γ -Tocoferol	Etanol	298	3868	Boulet, 2020

Una vez valoradas las soluciones “madre”, se construyeron curvas con un mínimo de seis concentraciones en el rango que se especifica en la **Tabla 21**. Para cada estándar, el valor de concentración más bajo inyectado es, además, el límite de detección.

Tabla 21. Rango de concentración para las curvas de calibración.

	Rango de concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Detector
Retinol	$3,0 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-3}$	UV/Vis
β -Caroteno	$6,0 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-3}$	UV/Vis
α -Tocoferol	$2,0 \times 10^{-4}$ - $3,0 \times 10^{-2}$	Fluorescencia
γ -Tocoferol	$6,5 \times 10^{-5}$ - $8,5 \times 10^{-3}$	Fluorescencia

4.12. Determinación de la oxidación lipídica

4.12.1. Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

La oxidación lipídica se determinó por medio del método espectrofotométrico de las TBARS de acuerdo a Fenaille et al. (2001). Se tomaron 5 g del queso funcional o del control, según fuera el caso, y se colocó esta alícuota en una bolsa de Stomacher. Se agregaron 12,5 mL de ácido tricloroacético (TCA, Merck, Darmstadt, Germany) al 20% preparado en ácido metafosfórico al 1,6% y se homogeneizó durante 2 minutos en dicho sistema. Luego, se le adicionaron 12,5 mL de agua bidestilada y se homogeneizó durante 30 segundos más. El homogenato resultante fue colocado en un tubo Falcon de 50 mL centrifugado a 6000xg durante 15 minutos a 4°C. Se tomaron tres alícuotas de 5 mL del sobrenadante. A dos de estos tubos se les adicionó 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma Aldrich, USA) 0,02 M a cada uno, mientras que al tercero se le agregaron 5 mL de agua bidestilada. Los tubos con el TBA conformarán muestra y duplicado, mientras que el tercer tubo será el blanco de turbidez. Se dejó reaccionar durante 1 h a 70 °C en baño de agua (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina). A continuación, luego de alcanzar la temperatura ambiente, se midió la absorbancia de las muestras y del blanco a 530 nm con un espectrofotómetro UV/Vis (Lambda Bio 20, Perkin-Elmer, Rotkreuz, Suiza). Se calculó la concentración usando como estándar 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en un rango de concentraciones de 0 a 0,5 μM . Los resultados se expresaron como mg equivalentes de malondialdehído (MDA) por kg de muestra.

4.12.2. Detección de peróxidos lipídicos empleando la técnica del valor peróxidos (VP)

La detección de peróxidos lipídicos empleando la técnica del VP se la realizó por el método espectrofotométrico de Kristensen et al. (2001). Los hidroperóxidos lipídicos oxidan el Fe^{2+} a Fe^{3+} , haciendo reaccionar posteriormente al Fe^{3+} con tiocianato de amonio, con lo cual se forma el complejo de color rojo correspondiente al tiocianato férrico. La absorbancia de este compuesto es directamente proporcional a la cantidad de hidroperóxidos lipídicos presentes.

Se colocaron 2 g de queso en un tubo Falcon de 15 mL, se le agregaron 10 mL de agua y se homogeneizó con un Ultra-Turrax (IKA, Alemania) por 45 segundos. El homogenato fue cuantitativamente transvasado a un tubo de vidrio de 50 mL con tapa a rosca y se le agregaron 20 mL de mezcla cloroformo – metanol (50:50 v/v). Se vortexea por 30 segundos y se centrifuga 10 minutos a 1000xg. La fase superior es descartada y la fase inferior se filtra con papel Whatman nº 2, reservándose en un tubo de vidrio con tapa a rosca. De allí se toman tres alícuotas de 2,5 mL cada una y se las coloca en sendos tubos. A dos de esos tubos se les adiciona 2,5 mL del complejo Fe^{2+} /tiocianato mientras que al tercer tubo se le agregan 2,5 mL de mezcla cloroformo/metanol (50:50 v/v). Se deja reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente y luego se mide a 500 nm la absorbancia resultante empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Lambda Bio 20, Perkin-Elmer, Rotkreuz, Suiza). La concentración de los compuestos se calculó utilizando una curva de calibración de Fe^{3+} en un rango de concentraciones de 0 a 0,02 μ g, expresándose el valor en miliequivalentes de oxígeno por kg de muestra.

4.13. Determinación del perfil de ácidos grasos

El contenido de grasa total (% de extracto etéreo) fue determinado por duplicado mediante el método de extracción por Soxhlet (AOAC 1999) modificado. Brevemente, se toman 3 g de queso y se deshidratan en mortero con 6 g de sulfato de sodio anhidro. La mezcla resultante fue seguidamente extraída utilizando un equipo “Soxtec System HT 1043 Extraction Unit” (Tecator, Suecia) para la extracción de grasa y una estufa (ORL, Hornos eléctricos, modelo NZ-1105, Argentina). La extracción fue realizada mediante reflujo con pentano (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) durante 90 minutos. Una vez extraída la grasa, se tomó de ella una alícuota de 25 mg y se la colocó en un tubo de vidrio al que se le adicionaron 4 mL de reactivo para metilesterificar (4% de HCl en metanol). Se agitó enérgicamente y se llevó a baño de agua a 72°C (Vicking, Modelo Dubnoff, Argentina), agitando cada 5 minutos con vortex para completar la reacción. Una vez concluida, se agregaron 2 mL de agua destilada, 2 mL de hexano y se agitó enérgicamente. Se centrifuga 5 minutos a 2000 rpm y se separó la fase superior de hexano conteniendo los metilésteres formados, reservándose esta fase en un tubo de hemólisis. Se realizó una nueva extracción con hexano, se agitó, se centrifugó y se separó la fase superior, la cual fue reunida con la anterior. Se inyectó 1 μ L del extracto resultante en un cromatógrafo gaseoso (Varian modelo CP 3800, USA) que cuenta con un detector FID. Se utilizó una columna capilar (CP-Sil 88, 100m x 0,25 mm x 0,20 μ m, Varian CP7489). El inyector se ajustó a 250°C y se utilizó Helio (1 mL/min) como gas carrier. La temperatura del horno de la columna se fija inicialmente a 45°C durante 4 min, luego se la incrementa hasta 165°C a razón de 13°C/min, manteniéndola luego constante durante 35 minutos. Finalmente, se incrementa

la temperatura hasta 215°C a razón de 4°C/min y se la mantiene durante 30 minutos. El tiempo total de la corrida cromatográfica es de 90 minutos.

Los ácidos grasos fueron identificados utilizando estándares externos de los ácidos grasos individuales (PUFA-2, Animal Source, Grain Fatty acid Methyl Ester Mix, Octadecanoic acid, conjugated, methyl ester, trans-11-Vaccenic methyl ester, cis-11-Vaccenic Methyl Ester, trans-9-Elaidic Methyl ester y 37-Component FAME mix; todos de Sigma-Aldrich, USA). Los resultados de cada ácido graso se expresan como porcentajes con respecto al total de ácidos grasos (ISO 15885-IDF; De la Fuente et al., 2015).

4.14. Análisis microbiológico y ensayo de antibióticos

Al ser productos destinados al consumo humano, en cada escalado que incluye la presente tesis (laboratorio, piloto e industrial), tanto la leche cruda utilizada como materia prima como los quesos obtenidos, fueron sometidos a ensayos microbiológicos para determinar el cumplimiento de los estándares de calidad exigidos por el Código Alimentario Argentino (Capítulo VIII: Alimentos Lácteos; Artículos Nº 556 tris y 605). Los mismos se enumeran a continuación así como el método de análisis empleado para las determinaciones y el criterio de calidad respectivo al que se debe ajustar:

1) *Para leche cruda:*

- Coliformes (UFC/mL): FIL 73A: 1985; FIL 100B: 1991 (≤ 10 UFC/mL).
- Mesófilos (UFC/mL): 13366 – ISO 1:2008; APHA 1992 Cap. 24 (Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 1992) (≤ 200000 UFC/mL).
- Recuento de células somáticas (cel./mL): método 13366 – ISO 1:2008 (< 400000 cel/mL).
- Residuos de antibioticos: Kit eclipspe 50 ISO 13969:2003 (ausencia).

1) *Para queso:*

- Coliformes 30°C (UFC/g): Recuento en placa FIL 73A, 1985 (≤ 100000 UFC/g).
- Coliformes 45°C (UFC/g): Recuento por NMP APHA 1992 Cap.24 (*) (≤ 5000 UFC/g).
- Bacterias anaerobias sulfito reductoras (UFC/g): ISO 15213:2003 (< 150 UFC/g).
- Estafilococo coagulasa positivo (UFC/g): Recuento en placa FIL 145, 1990 (< 1000 UFC/g).
- *Escherichia coli* presuntiva (presencia/g): ISO 16654:2001 (ausencia).
- *Listeria spp.* (presencia/25 g): FIL 143, 1990 (presencia/ausencia).

- *Salmonella spp.* (presencia/25 g): FIL 93A, 1985 (ausencia).
- *Bacillus cereus* (UFC/g): Recuento por NMP ISO 21871:2006 (≤ 100000 UFC/g).

Para el caso particular del análisis descripto como “Residuos de Antibióticos” el mismo es aplicado a leche cruda. Se utilizó el Kit Eclipse 50 ® de la marca ZEULAB ® (Zaragoza, España) el cual se encuentra validado bajo la norma ISO 13969:2003.

Cabe mencionar que los análisis realizados a la leche cruda, incluyendo el de presencia de antibióticos, fueron realizados en las plantas piloto o industrial (según corresponda) antes de comenzar las respectivas elaboraciones, ya que son análisis que deben realizarse de rutina para controlar la materia prima a emplear. En lo que respecta a los análisis microbiológicos realizados a los quesos obtenidos a escala piloto, los mismos se realizaron en el Laboratorio de Calidad de Leche de la EEA-Rafaela (Santa Fe), mientras que para los quesos obtenidos a escala industrial los análisis fueron realizados en el centro de referencia para la industria láctea FUNESIL (Fundación Cultural de Profesores y Amigos de la Escuela Superior Integral de Lechería, Villa María, provincia de Córdoba).

4.15. Microscopía confocal

Se utilizó un microscopio confocal láser de barrido Olympus FV300/BX61 (Tokio, Japón) trabajando con excitación dual de 488 nm/633 nm para *Nile Red/Nile Blue* como colorantes para la identificación simultánea de proteínas (rojo) y grasas (azul), respectivamente.

Se cortó una delgada feta de queso por medio de un bisturí. Se la colocó extendida sobre un portaobjetos de vidrio y se le agregaron 50 μ L de la solución de *Nile Red* (0,02 g/L) y *Nile Blue* (0,1 g/L) en PEG200 y agua bidestilada (filtrada por membrana de 0,45 μ m), dejándola actuar por 10 min. Seguidamente se colocó un cubreobjetos antes de proceder a la observación en el microscopio. Se obtuvieron las imágenes en “.TIFF” con el FluoView Application Software (Tokio, Japón).

Las imágenes fueron posteriormente analizadas por medio del software ImageJ 1.52a (National Institute of Health, USA). Brevemente, cada imagen se procesa en blanco y negro, quedando en blanco la matriz proteica y en negro las gotas de grasa. A su vez, se trabaja con herramientas del software para disminuir posibles defectos de la micrografía. Luego del procesado, y con la ayuda de las herramientas provistas por el programa, se obtiene un “mapa” de la foto en donde cada gota de grasa, para nuestro caso, se enumera. Al mismo tiempo, el programa arroja una tabla con el número de la gota, el diámetro y el área correspondiente.

4.16. Análisis estadístico

Se comprobó el cumplimiento de los supuestos de aleatorización, normalidad y homogeneidad de varianzas. Para comparar entre tratamientos los resultados obtenidos de cada análisis, se realizó un ANOVA seguido del análisis de comparaciones múltiple (*test post hoc*) de Tukey para la comparación de medias entre todos los grupos estudiados, con un nivel de significación de $p<0,05$.

El análisis de componentes principales (PCA) fue realizado utilizando el software Statistix (versión 7.0 – 2008, USA).

5. Resultados y discusión

5.1. Validación de la técnica cromatográfica para la detección y cuantificación de los fitoesteroles

En la **Figura 30** se muestra el cromatograma resultante del método analítico. Si bien, no se pudo lograr la resolución completa a la línea de base entre el campesterol (pico 1) y el estigmaesterol (pico 2), las formas de ambas señales son consistentes. Para el caso del β -sitoesterol (pico 3), en cambio, se logró una buena resolución.

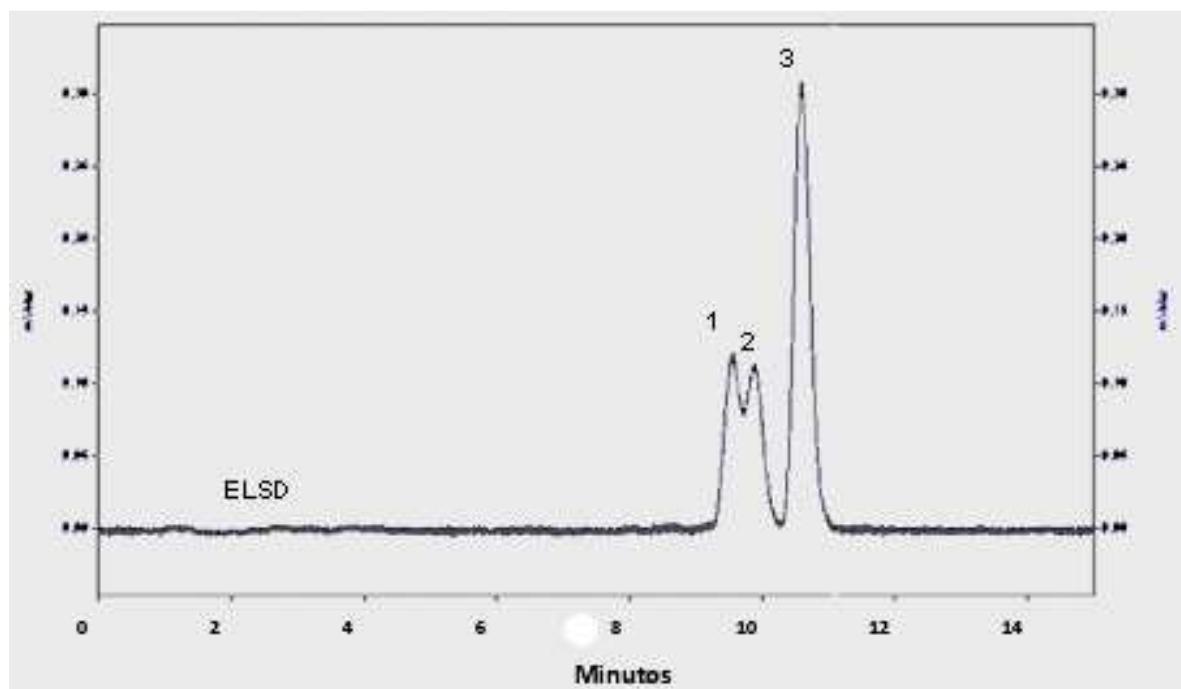


Figura 30. Cromatograma con detección ELSD, para un mix de estándares. El orden de elución de los analitos fue campesterol (1), estigmaesterol (2) y β -sitoesterol (3).

5.1.1. Linealidad, rango y límite de detección

Las ecuaciones de regresión de las curvas de calibración de mejor ajuste y sus coeficientes de correlación (R^2) se muestran en la **Tabla 22**. Si bien en búsquedas bibliográficas (Slavin et al., 2012) se observó que la respuesta del detector ajustaba mejor a una ecuación logarítmica ($y = ax^b$), para el caso de la presente tesis si bien también se ajustó adecuadamente a una ecuación logarítmica (datos no mostrados), se eligió, para los tres fitoesteroles, ecuaciones lineales ya que presentaban mejor ajuste (R^2) como se muestra en la **Tabla 22**. En lo referido al límite de cuantificación, se toman los valores mínimos y máximos de los rangos mostrados.

Tabla 22. Rango de concentración, ecuaciones de ajuste y coeficiente de regresión R^2 para las curvas de calibración en ELSD.

	Rango de concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Detector	Ecuación de regresión ajustada	R^2
β Sitoesterol	5-400	ELSD	$y = 1,26 \times 10^8 x - 3,04 \times 10^5$	0,998
Estigmaesterol	5-200	ELSD	$y = 1,35 \times 10^8 x - 3,31 \times 10^5$	0,997
Campesterol	5-200	ELSD	$y = 9,34 \times 10^7 x - 5,48 \times 10^5$	0,999

5.1.2. Precisión y repetibilidad

En la **Tabla 23**, se muestran los resultados de las pruebas de precisión y repetibilidad. Las inyecciones de la misma muestra se utilizaron para validar la precisión y la consistencia de la metodología HPLC desarrollada. Puede verse que la variación intramuestra se mantuvo por debajo del 5%. Con respecto a las variaciones intra e interdía, se puede observar que existe una variabilidad mayor, lo que resulta esperable de acuerdo a variabilidad en lo que respecta a la preparación de la muestra. De todos modos y para todos los casos, la variabilidad se mantuvo por debajo del 10%, resultados acordes con lo cotejado en la bibliografía (Slavin et al., 2012; Schmidt et al., 2017; Al-Suod et al., 2018).

Tabla 23. Precisión y repetibilidad del método analítico.

	Intramuestra (n=3)	Intradía (n=3)	Interdía (n=3)
g FEL/g FEE Advasterol ester ®			
Campesterol ¹	0,110 ± 0,011	0,120 ± 0,039	0,106 ± 0,031
Estigmaesterol ¹	0,155 ± 0,017	0,148 ± 0,059	0,150 ± 0,052
β -Sitoesterol ¹	0,264 ± 0,025	0,256 ± 0,034	0,255 ± 0,068

¹ Se informa la media ± desvío estándar (n=3).

5.1.3. Recuperación

Los valores de recuperación se muestran en la **Tabla 24**. Como puede observarse, a pesar de las severas condiciones de saponificación (2 horas a 70°C en medio alcalino) los valores de recuperación en las tres matrices y para los tres analitos fue en todos los casos superior al 90%. Además, como la recuperación se ensayó a dos niveles de enriquecimiento, también pudo demostrarse que la recuperación fue adecuada para ambos niveles.

Tabla 24. Valores de recuperación de fitoesteroles en leche, crema y queso.

	Leche	Crema	Queso
Campesterol			
Concentración ² de <i>spike</i> (μ g)	10	10	10
% Recuperación ¹ (<i>n</i> =3)	97,3 \pm 11,1	92,1 \pm 7,2	91,0 \pm 10,0
Concentración ² de <i>spike</i> (μ g)	25	25	25
% Recuperación ¹ (<i>n</i> =3)	98,4 \pm 9,8	94,5 \pm 14,2	93,8 \pm 12,4
Estigmaesterol			
Concentración ² de <i>spike</i> (μ g)	10	10	10
% Recuperación ¹ (<i>n</i> =3)	98,3 \pm 10,1	90,9 \pm 7,0	91,5 \pm 14,2
Concentración ² de <i>spike</i> (μ g)	25	25	25
% Recuperación ¹ (<i>n</i> =3)	95,2 \pm 10,8	92,9 \pm 10,7	90,5 \pm 11,1
β-Sitoesterol			
Concentración ² de <i>spike</i> (μ g)	10	10	10
% Recuperación ¹ (<i>n</i> =3)	99,3 \pm 13,8	91,1 \pm 3,8	90,9 \pm 17,2
Concentración ² de <i>spike</i> (μ g)	50	50	50
% Recuperación ¹ (<i>n</i> =3)	97,2 \pm 19,1	94,5 \pm 18,2	93,8 \pm 16,8

¹ Valores representados por la media \pm desvío estándar.

² La concentración del *spike* para la leche se midió en (μ g/mL), mientras que para la crema y el queso se midió en (μ g/mg).

5.2. Linealidad, rango y límite de detección para la detección y cuantificación simultánea de tocoferoles, β -caroteno y retinol

En la sección 4.11.5 se describió la técnica cromatográfica basada en Buttriss y Diplock (1984). La Dra. Rossetti, investigadora del grupo de trabajo, desarrolló la técnica en nuestro laboratorio para leche, crema y queso (Rossetti et al., 2015). Las ecuaciones de regresión que presentaron el mejor ajuste y sus coeficientes de regresión (R^2), correspondientes a las curvas realizadas con los estándares, se presentan en la **Tabla 25**. Con respecto al límite de cuantificación, se toman los valores mínimos y máximos de los rangos mostrados. Todas las curvas de calibración realizadas ajustan a ecuaciones lineales y presentan buenos coeficientes R^2 en el rango de concentraciones estudiadas.

Tabla 25. Rango de concentración, ecuaciones de ajuste y R^2 para las curvas de calibración realizadas en detectores UV/Vis y fluorescencia.

	Rango de concentración (mg/mL)	Detector	Ecuación de regresión ajustada	R^2
Retinol	$3,0 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-3}$	UV/Vis ¹	$y = 8,91 \times 10^8 x + 7,78 \times 10^2$	0,997
β -Caroteno	$6,0 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-3}$	UV/Vis ²	$y = 1,32 \times 10^9 x - 7,27 \times 10^4$	0,998
α -Tocoferol	$2,0 \times 10^{-4}$ - $3,0 \times 10^{-2}$	Fluorescencia ³	$y = 3,28 \times 10^8 x + 5,30 \times 10^4$	0,999
γ -Tocoferol	$6,5 \times 10^{-5}$ - $8,5 \times 10^{-3}$	Fluorescencia ³	$y = 3,68 \times 10^8 x - 9,24 \times 10^3$	0,999

¹ 325 (nm)

² 445 (nm)

³ 296-330 (nm) (ex - em)

5.3. Etapas de madurez tecnológica (TRL: *Technology readiness levels*)

A los fines de atravesar todos los pasos necesarios para llegar a la innovación mediante la generación de conocimientos, la utilización de los TRLs es una ayuda importante para definir el grado de madurez tecnológica en el cual se ha centrado este trabajo, el cual correspondió a un proyecto de Innovación con la industria a través del “Consorcio CIA-Productos Lácteos Villa María”, tal como fuera arriba detallado.

Los ensayos realizados fueron ubicados en los diferentes niveles tecnológicos para situarlos en el camino de la innovación, según las definiciones expuestas en la **Tabla 26**.

5.3.1. Planteo de las diferentes etapas de investigación y de madurez tecnológica

Para planificar y plantear el desarrollo del producto funcional se utilizó el modelo *Technology Readiness Level* (TRL). Se trata de un sistema de medición que permite evaluar la madurez alcanzada por una tecnología particular y la comparación consistente entre los niveles de madurez alcanzados por diferentes tipos de tecnología. El TRL de una tecnología se determina mediante una Evaluación de la Madurez Tecnológica (TRA) donde se examinan los conceptos del programa, los requisitos tecnológicos y las capacidades tecnológicas demostradas. Los TRLs se determinan utilizando una escala del 1 al 9, siendo 9 la tecnología más madura (Héder, 2017). El precursor de este modelo fue la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*, EEUU) en 1974. El Departamento de Defensa de los Estados Unidos ha utilizado la escala para adquisiciones desde principios de la década del 2000. En 2008, la escala estaba también en uso en la Agencia Espacial Europea (ESA), como lo demuestra su manual (Héder, 2017). Luego de su implementación, posterior éxito y divulgación, fue así que muchos organismos como la Agencia Espacial Europea (ESA), el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DoE), el Departamento de Seguridad Nacional (DHS) y el Departamento de Defensa entre otros tomaron y adaptaron este sistema según sus necesidades específicas, pero siguiendo siempre un esquema similar al original. En el 2010, la Comisión Europea aconsejó a los proyectos de investigación e innovación financiados por la Unión Europea que adoptaran esta escala. Por ello, los TRLs se utilizaron en 2014 en el programa Horizonte 2020 de este último organismo. En el 2013, la escala TRL fue formalizada aún más mediante el estándar ISO 16290:2013 (Héder, 2017).

Tabla 26. Modelo *Technology Readiness Level* (TRL).

Nivel tecnológico			Ejemplo
TRL 9	En casi todos los casos, este es el final de los últimos aspectos de "corrección de errores" del verdadero desarrollo del sistema. Esta TRL no incluye la mejora planificada del producto.	Despliegue	Producto: Con empresas asociadas.
TRL 8	Este nivel se alcanza una vez demostrado que la tecnología funciona en su forma final y en las condiciones esperadas. En casi todos los casos, este nivel es el fin del verdadero modelo.	Producto o servicio comercializable. Certificaciones pruebas específicas	Nivel pre-comercial: Con empresas asociadas.
TRL 7	Este nivel requiere una demostración del prototipo real en un ambiente real. El prototipo debe ser o estar lo más próximo a la escala del sistema real planificado y la demostración se debe realizar en lugares lo más reales posible.	Prototipo/Demostrador Desarrollo tecnológico	Prototipo: con empresas y vinculación tecnológica (protección intelectual, patentes, regalías, etc.)
TRL 6	El prototipo se probará en un entorno relevante (industria).		Escala piloto II
TRL 5	Los elementos tecnológicos básicos deben integrarse con elementos de apoyo razonablemente realistas para que todas las aplicaciones (nivel de componente, nivel de subsistema o nivel de sistema) puedan probarse en un entorno "simulado" o lo más real posible.	Prototipo/Demostrador Desarrollo tecnológico	Escala piloto I
TRL 4	Luego de validar el "prototipo", se integra el elemento tecnológico para lograr niveles de desempeño adecuados. Esta validación debe diseñarse para respaldar el prototipo que se formuló anteriormente y también debe ser coherente con los requisitos de las aplicaciones potenciales del sistema.		Incubación, escalado.
TRL 3	En este paso del proceso de maduración del proyecto, se inicia la combinación de la investigación y el desarrollo. Esto debe incluir tanto estudios analíticos para establecer la tecnología en un contexto apropiado como estudios de laboratorio para la validación y, finalmente, constituir el "prototipo" de las aplicaciones y conceptos formulados en el TRL 2.	Prueba de concepto: Investigación industrial	Trabajo con incubadoras tecnológicas.
TRL 2	La invención comienza una vez observados los principios básicos y las aplicaciones prácticas. Si bien la aplicación es especulativa y no hay ninguna prueba o análisis detallado para apoyar el supuesto, la aplicación práctica está identificada.		Tesis de Magíster y Doctorado a escala laboratorio.
TRL 1	La investigación científica comienza a visualizarse como investigación aplicada y desarrollo luego del planteo de la hipótesis experimental.		Revisión bibliográfica del estado del arte, planteo de las hipótesis y revisión de publicaciones.

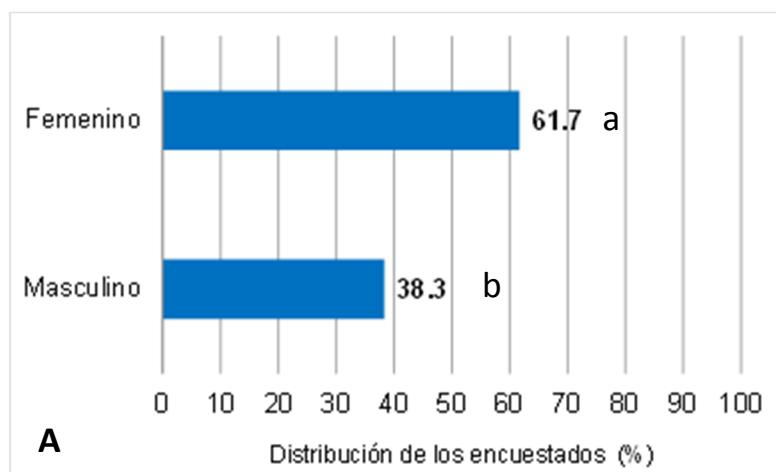
Como se observa en la **Tabla 26**, un producto que llega al mercado alcanza el nivel 9. El presente trabajo de tesis se situó a partir del nivel 3 de investigación básica, estudiando la factibilidad de la incorporación de fitoesteroles en el producto queso *light*, el cual se encuentra definido y protocolizado en la industria. De este modo, el trabajo comenzó con un nivel de madurez tecnológica avanzado, TRL 3, con respecto a un ensayo *de novo* de laboratorio, para pasar luego a los niveles 4 a 7 que abordaron el desarrollo tecnológico y, finalmente, la puesta en mercado correspondiente a las etapas siguientes hasta alcanzar el TRL 9.

**5.3.1.1. Definición de la matriz. Comparación queso Por Salut *light* vs queso Mozzarella *light*:
Datos de preferencia de los encuestados (TRL 1 y TRL 2)**

Como primera medida, se debía elegir el tipo de queso sobre el cual trabajar. La empresa CDS-Lácteos Capilla del Señor normalmente produce dos quesos reducidos en calorías o *light* (Resolución Conjunta 40/2004, incorporada al Código Alimentario Argentino, Artículo 235 quinto; InfoLEG, 2004) de salida comercial con los cuales se podía plantear el trabajo de adición de fitoesteroles, esto es, el queso Por Salut y el queso Mozzarella. Las tecnologías de elaboración de ambos son diferentes ya que el primero, luego de la cuajada, se incuba directamente en la cámara de ajuste del pH, mientras que el segundo requiere de una doble cocción, esto es, cuajada en la tina quesera a 40°C y posterior cocción en baño a 80°C, seguido del proceso de hilado. A partir de allí los quesos se salan y se envasan a las 48 h, saliendo como un queso tipo fresco de pasta blanda.

Para decidir con cuál de los dos tipos de queso *light* trabajar se planteó el ensayo de preferencia con consumidores, el cual se realizó aprovechando la afluencia de público a la exposición INTA Expone 2012, en la ciudad de Cerrillos, Salta, tal como fuera arriba explicado en la sección 4.1. Cabe aclarar que tanto los asistentes a la exposición como los encuestados provenían de distintos lugares de la república Argentina.

Como se observa en la **Figura 31A**, de los 141 encuestados la mayoría ($p<0,05$) son mujeres. En cuanto a la edad (**Figura 31B**), se distribuyeron en forma pareja en todos los grupos etarios ($p<0,05$), con estudios terciarios en su mayoría ($p<0,05$) (**Fig. 31C**). Además, en la **Figura 32** se observa que la mayoría de los encuestados no solamente resultaron ser las personas responsables en su hogar a la hora de realizar las compras, sino que además consumían quesos habitualmente.



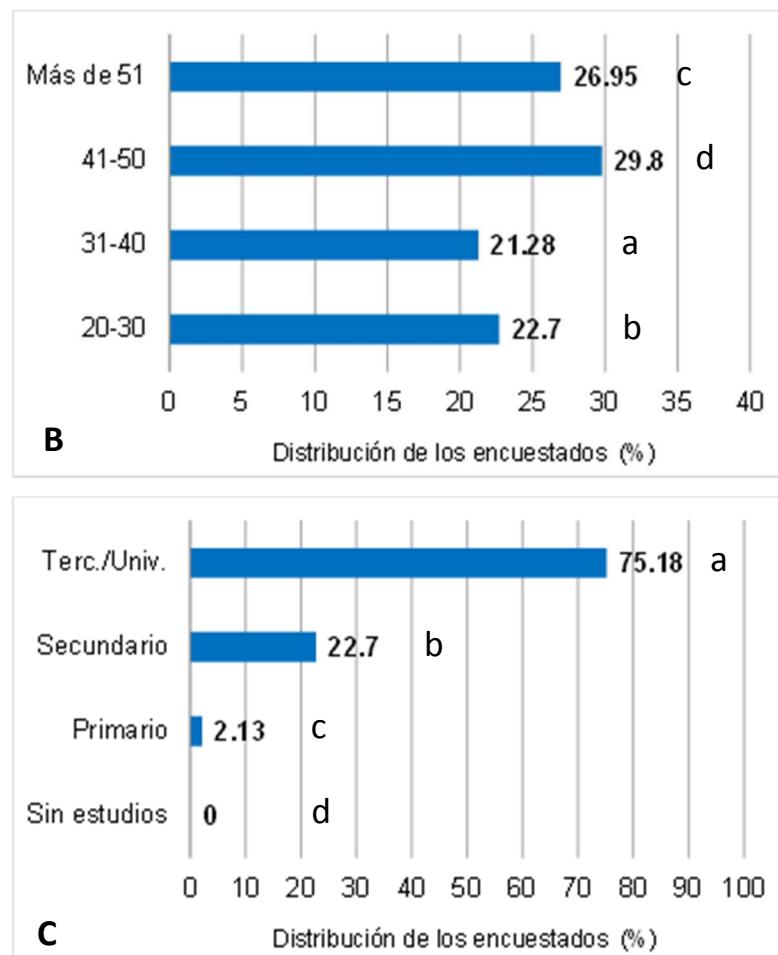


Figura 31. Distribución de los encuestados de acuerdo al sexo (A), la edad (B) y al nivel de formación (C). Letras diferentes en una dada figura implica diferencias significativas ($p<0.05$).

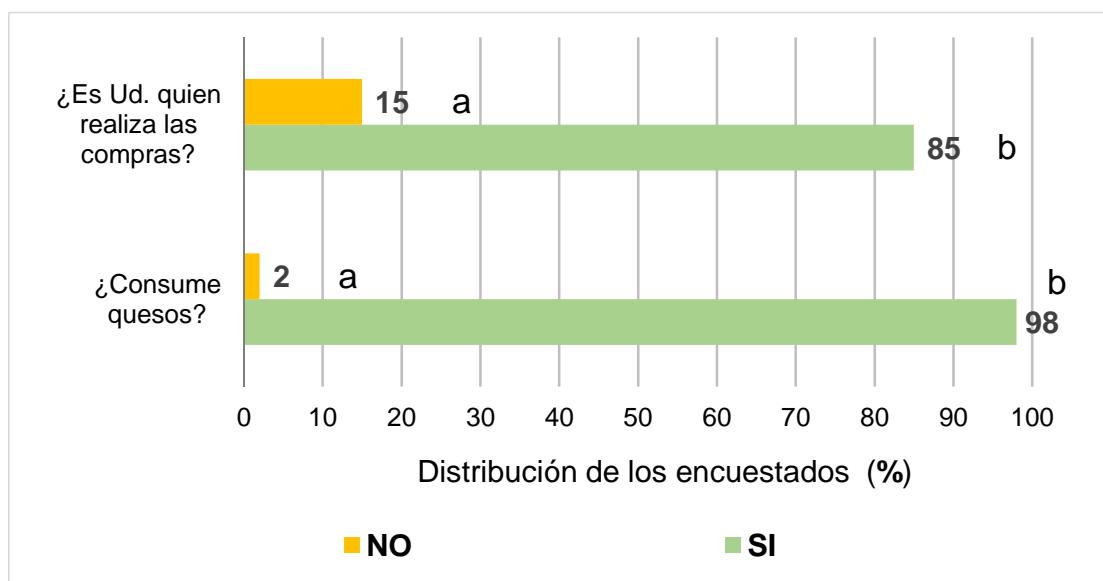


Figura 32. Evaluación de realización de compra y consumo de queso. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0,001$).

Una vez realizadas las preguntas generales, a los participantes de la encuesta se los invitaba a probar dos cubos de los quesos objeto del panel de preferencia de consumidores para así, de esa manera, definir cuál iba a ser el queso sobre el cual llevar a cabo el desarrollo del producto funcional. Las muestras se codificaron para que los entrevistados no se vieran influenciados al momento de la evaluación. Cuando se los interrogó acerca de los atributos de sabor y textura, el preferido fue el queso *Por Salut light* en un 87,95% y 80,14 % acumulado para me gusta y me gusta mucho (máximos valores de escala), respectivamente, mientras que los mismos para la mozzarella *light* fueron de 63,13% y 66,67%, respectivamente (Fig. 33). Evaluando los dos valores máximos de la escala para ambos tipos de queso, se obtuvo como resultado la preferencia por el queso *Por Salut* sobre la Mozzarella.

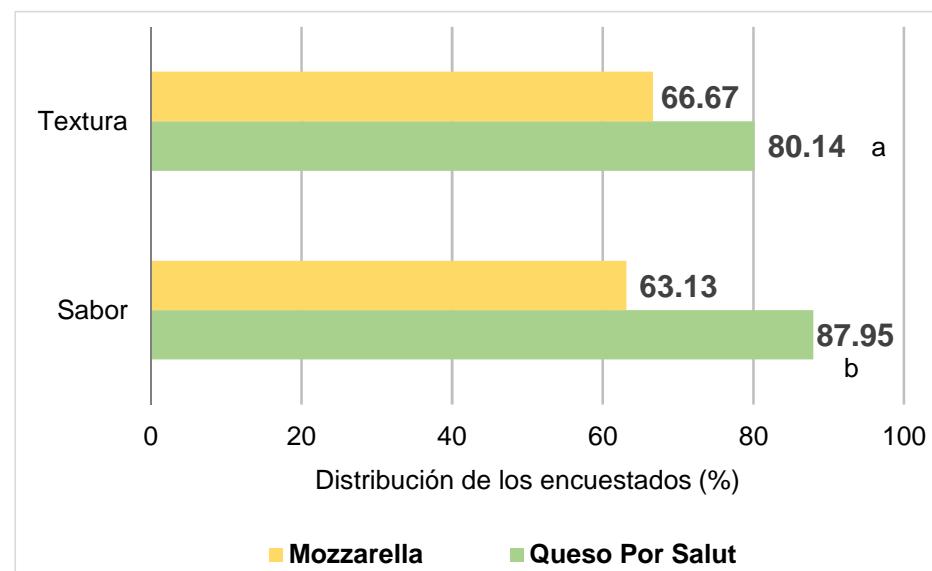


Figura 33. Atributos textura y sabor (%) en queso *Port Salut light* y en queso mozzarella *light*. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0,001$).

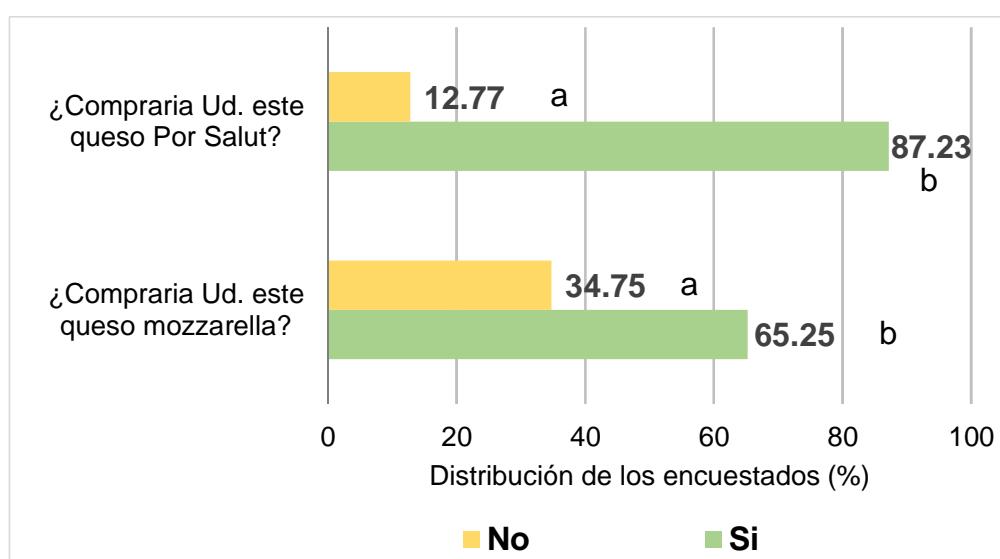


Figura 34. Percepción general del producto: queso *Por Salut light* y queso *Mozzarella light*.

A continuación, se preguntó a cada uno de los encuestados si elegiría comprar este tipo de quesos frente a otros disponibles en el mercado (**Fig. 34**), saliendo en ello favorecido el queso Por Salut *light* como preferencia de compra (87,23%) frente a la mozzarella *light* (65,25%).

En cuanto a los atributos de textura y sabor evaluados, en ambos salió favorecido el queso Port Salut *light* (**Fig. 35A**) frente al mozzarella *light* (**Fig. 35B**). En el primer caso, la textura y el sabor fueron bien calificados con un total de algo más del 80% para la textura y del 88% para el sabor (**Fig. 35A**). Para el segundo tipo de queso, la textura fue favorecida en un 66,7%, mientras que el sabor lo fue en algo más de un 63% en total (**Fig. 35B**).

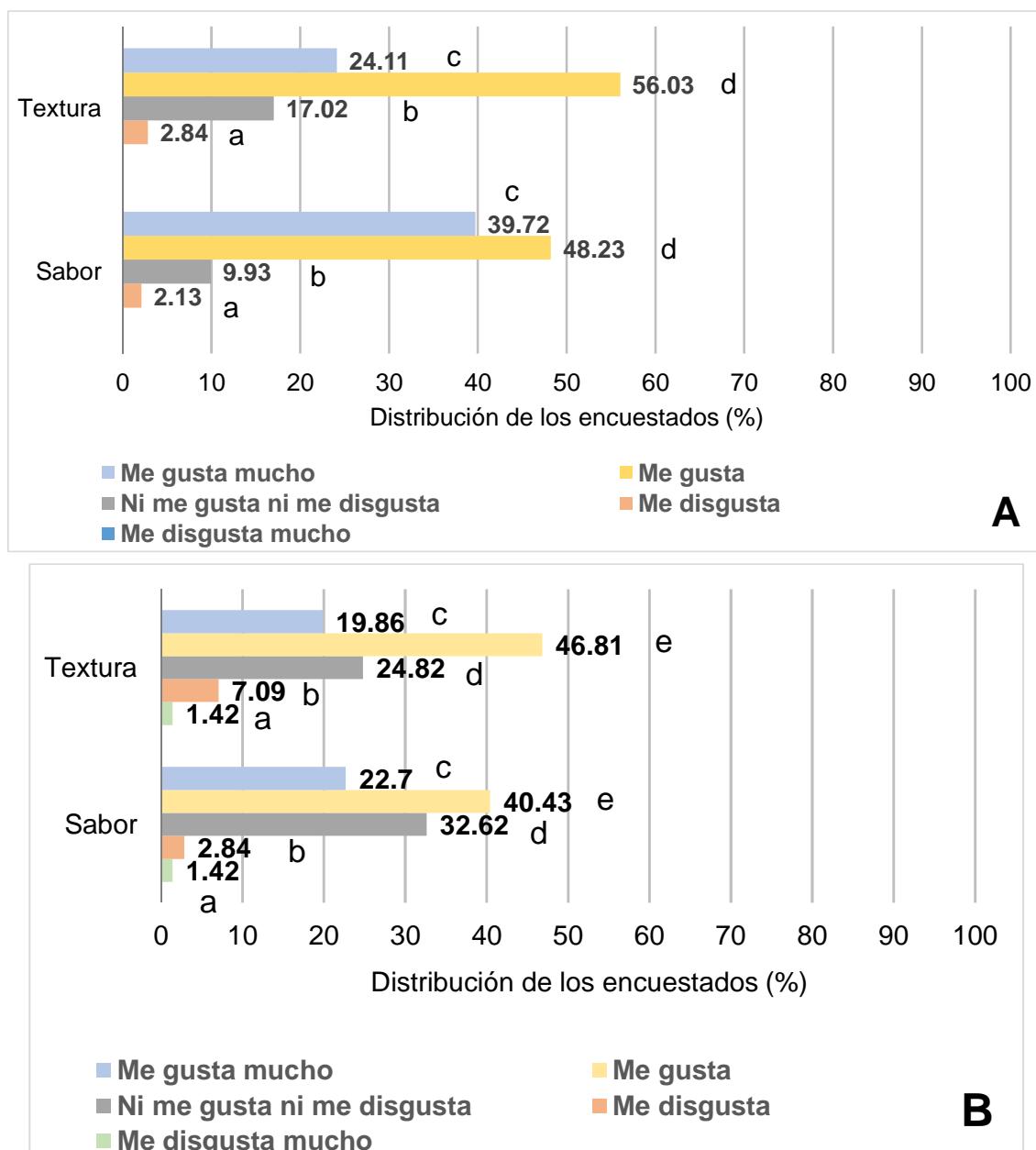


Figura 35. Atributos de textura y sabor (%) en queso “Port Salut” *light* (A) y en queso “mozzarella” *light* (B).

La preferencia por ambos tipos de queso aumentó cuando se incluyó el factor “funcional” en la pregunta, es decir, si consumiría ese queso en el caso de que aportara algún beneficio para la salud. Si evaluamos el consumo del queso *Por Salut light* (Fig. 36A) con respecto al de la mozzarella *light* (Fig. 36B), podemos observar que el primero fue el preferido por el 92,2 % de los consumidores (diferencias muy significativas $p<0,001$), superando al 89,36 % de los encuestados que compraría el queso Mozzarella *light*. Las respuestas negativas fueron mayores para la mozzarella, de modo que los consumidores la eligieron “menos”, aun cuando esta podría traer un beneficio.

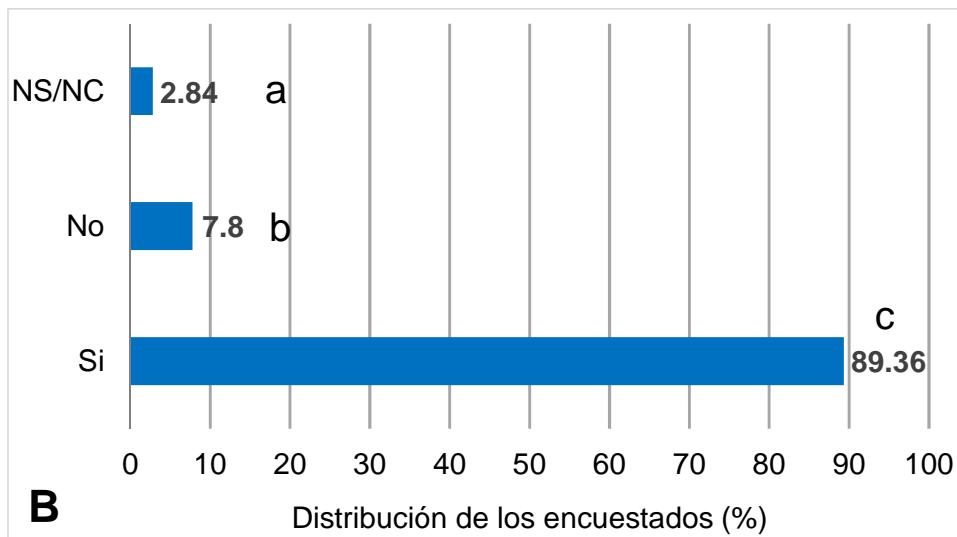
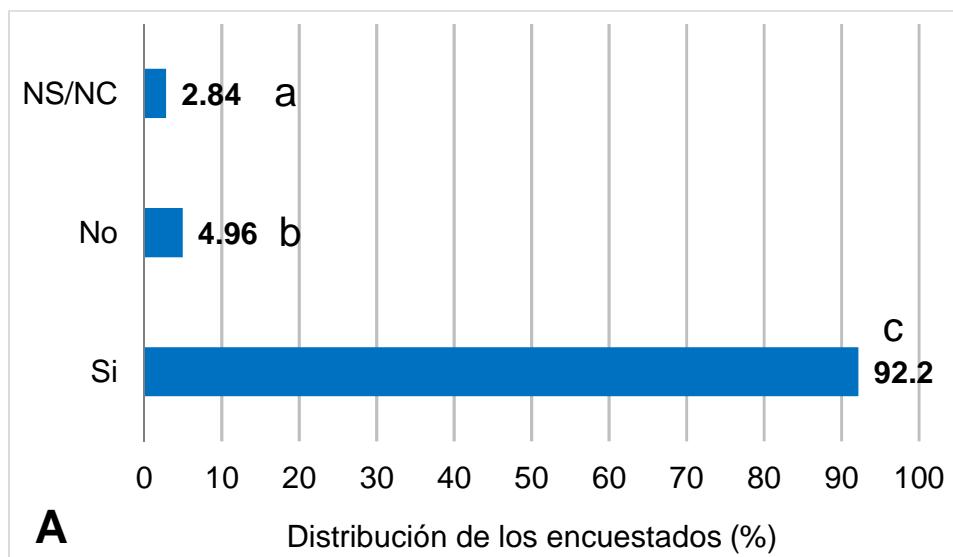


Figura 36. Porciento de preferencia con respecto a la posibilidad de consumir un producto que además sea “funcional”, es decir, que contribuya a la mejora de la salud: queso “Por Salut” *light* (A) y queso “mozzarella” *light* (B).

A partir de estos resultados, se decidió entonces continuar el desarrollo que involucra la presente tesis con el queso Por Salut *light* para su transformación en funcional por el agregado de fitoesteroles.

5.3.1.2. Análisis de etapas críticas para la adición de fitoesteroles al queso Por Salut *light*

Para la elaboración del queso, la leche debió ser sometida a descremado y estandarizado de la materia grasa, previos a la pasteurización (sin homogeneizar), tal como se explicó en las secciones 4.4 y 4.8. Este punto es el primero en el cual se podía proponer la adición de fitoesteroles (etapa 1: llenado del tanque pulmón) (**Figs. 27 y 28**), a fin de pasteurizar en conjunto los fitoesteroles y la leche y evitar el riesgo de introducir una contaminación en el sistema con posterioridad al pasteurizado.

Por otro lado, en la industria láctea este proceso debía llevarse a cabo en *batch*, ya que una adición continua no sería factible por el tipo de equipos y procesos disponibles, los cuales forman un sistema cerrado entre el pasteurizador y la tina quesera (**Fig. 27**). Sin embargo, el procesamiento térmico de los fitoesteroles podía, probablemente, provocar su degradación. Por eso, de no ser posible la adición en esta etapa, se podía proponer la adición directa en la tina, durante la formación de la cuajada (etapa 6) (**Fig. 27**), con el consiguiente riesgo de introducir una contaminación.

De no resultar las anteriores propuestas, la última posibilidad de incorporación de los fitoesteroles podía ser la inmersión, para alcanzar la difusión hacia el interior de la matriz, con los inconvenientes de los volúmenes industriales utilizados, la dilución de los compuestos bioactivos y la falta de homogeneidad de la mezcla por el gradiente de concentración dentro de la matriz.

5.4. Ensayos a nivel laboratorio. Etapas TRL 3 y 4

5.4.1. Caracterización analítica de los fitoesteroles a utilizar

La caracterización química se realizó en las preparaciones de fitoesteroles comerciales a fin de conocer las proporciones de los diferentes isómeros y la composición de los ácidos grasos aportada por las preparaciones esterificadas, la cual podría generar un sistema vulnerable a la oxidación a la hora de plantear un producto final estable. Para tal fin, se utilizó la metodología cromatográfica descrita en las secciones 4.10 y 4.12, resultando una recuperación del 90% para el caso particular de todos los esteroles vegetales.

Las preparaciones comerciales de fitoesteroles utilizadas fueron descriptas en las secciones 4.3 y 4.6. Como allí fuera mencionado, se trata de Advasterol 90® (FEL), Advasterol Ester® (FEE) y Emulfit 3675 AE® (FEEM).

Como se observa en la **Tabla 27**, el Advasterol 90® (FEL) mostró la mayor concentración de fitoesteroles por gramo de producto con respecto a las preparaciones esterificada (Advasterol Ester®) y emulsificada (Emulfit 3675 AE®). Este resultado es lógico ya que el Advasterol 90 es *per se* una preparación de fitoesteroles libres.

Tabla 27. Concentración de fitoesteroles en las tres materias primas, que fuera determinada en el presente trabajo por HPLC.

Fitoesteroles libres (g FEL/g)					
	Beta sitoesterol	Campesterol	Estigmaesterol	FEL totales ¹	
Emulfit AE 3675 ®	0,218 ± 0,0006	0,106 ± 0,0003	0,132 ± 0,0003	0,455 ^a ± 0,0012	
Advasterol ester®	0,253 ± 0,0001	0,106 ± 0,0000	0,158 ± 0,0001	0,517 ^b ± 0,0002	
Advasterol 90®	0,387 ± 0,0008	0,150 ± 0,0003	0,273 ± 0,0006	0,810 ^c ± 0,0017	

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$)

¹Fitoesteroles libres (FEL) totales expresados como la suma de fitoesteroles (FE) individuales.

Este dato es importante para los cálculos de rendimiento teórico en el queso. La premisa de elaboración es cargar en el queso la dosis de fitoesteroles recomendada por la *European Food Safety Authority* (EFSA, 2010), esto es, de 2 a 3 g de fitoesteroles libres (FEL) diarios requeridos para mostrar efecto hipocolesterolémico. Al mismo tiempo, tampoco agregar un exceso, lo cual no resultaría adecuado en el balance económico del producto. Este resultado de FEL (**Tabla 27**) debe tenerse en cuenta en el balance de masa con los FEE (Advasterol Ester®) ya que, en éstos, el 40% de su masa corresponde a los ácidos grasos (AG) esterificados.

Los resultados obtenidos de la cuantificación en los productos comerciales (**Tabla 27**) se compararon con los valores reportados por los fabricantes (**Tabla 28**). Se puede observar en la **Tabla 27** que las concentraciones de FEL totales fueron 0,455; 0,517 y 0,810 g por gramo de producto Emulfit AE 3675®, Advasterol Ester® y Advasterol 90®, respectivamente. Las proporciones de los mismos son del orden de las expresadas en las especificaciones técnicas de los productos (**Tabla 28**).

Tabla 28. Valores típicos informados por cada fabricante,¹ expresados en por ciento con respecto al peso total del producto.

	Beta sitoesterol (%)	Campesterol (%)	Estigmaesterol (%)	Esteroles totales (%)
Emulfit AE 3675®(Saporiti S.A.)	22-35	11-17	13-22	69
Advasterol ester ® (AOM S.A.)	37-53	17-31	21-35	98
Advasterol 90 ® (AOM S.A)	34-50	17-30	22-30	92

¹Las especificaciones técnicas de los productos comerciales se encuentran en el capítulo anexo.

La determinación por cromatografía líquida HPLC tiene la ventaja de que no hace falta derivatizar el producto y tiene mayor versatilidad de polaridades entre la fase móvil y la fase estacionaria, permitiendo así desarrollar un método único para la detección de fitoesteroles en queso, pero además en leche y en crema. Los datos presentados demuestran que tanto la metodología de extracción como la metodología HPLC-ELSD son precisas y exactas para evaluar estos compuestos, no solamente en las matrices lácteas antes descriptas sino además en las tres presentaciones comerciales de fitoesteroles que se evaluarán en la presente tesis. Si bien en bibliografía se reporta que los detectores ELSD introducen ciertas variaciones que hacen que no sea un método de los más sensibles (Slavin & Yu, 2012; Schmidt et al., 2017; Al-Suod et al., 2018), los valores de desviación estándar inferiores al 5% observados para los rangos de concentraciones estudiados son muy aceptables (**Tabla 27**). En cuanto a los porcentajes de recuperación del método extractivo, pudo verificarse que en matrices de naturaleza más sólida o grasa existe una tendencia a la disminución de la recuperación. De todos modos, para los dos enriquecimientos ensayados, y para las tres matrices, la recuperación siempre se mantuvo por encima del 90 %.

La técnica analítica permitió el control de las elaboraciones con un rango de mayor exactitud que el reportado por los fabricantes, ya que los errores de concentración de los aditivos a escala industrial son altamente costosos si no se estiman correctamente las concentraciones de partida y las del producto final.

En cuanto a la técnica de extracción, detección y cuantificación simultánea de los isómeros α - y γ -tocoferol, β -caroteno y retinol, esta técnica es de rutina y se encuentra puesta a punto en nuestro laboratorio para las matrices mencionadas (leche, crema y queso). De todos modos, a modo de control, se realizaron curvas de calibración para todos los compuestos mencionados anteriormente, demostrando la consistencia del método extractivo y del cromatográfico, ya que se compararon con trabajos realizados por el grupo de investigación (Rossetti, 2015; Gies et al., 2019).

5.4.2. Grasa total y perfil de ácidos grasos (AG) de los fitoesteroles esterificados (FEE)

Como los fitoesteroles se encuentran esterificados con AGs en el producto comercial Advasterol ester®, fue necesario conocer el perfil y concentración de los AGs (**Tabla 29A**) y el contenido de grasa total (**Tabla 29B**). Además, al provenir de una oleaginosa, es de esperar que contenga tocoferoles, con lo cual también fue necesario realizar su cuantificación (**Tabla 29C**).

Tabla 29A. Composición de los ácidos grasos en la fracción correspondiente a la muestra de fitoesteroles esterificados, FEE (Advasterol ester®).

Ácidos grasos	Contenido (%) ¹	p
16:0	4,76	*
18:0	1,15	*
18:1 t	0,16	NS
18:1 n-9 c	25,19	**
18:1 n-7	0,14	NS
18:2 n-6 (AL)	67,42	**
18:3 n-3 (ALA)	0,75	*
20:1 n-9	0,14	NS
20:4 n-6	0,30	NS

¹Porcentaje con respecto al contenido total de ácidos grasos en el producto comercial.
NS: no significativo; * p<0,05; ** p<0,001.

Tabla 29B. Contenido de grasa total de los fitoesteroles esterificados, FEE (Advasterol ester®).

Muestra	Grasa (%) ¹
Advasterol ester ®	40,54 ± 0,1

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (n = 5)

Tabla 29C. Contenido de tocoferoles (mg/g) de los fitoesteroles esterificados, FEE (Advasterol ester®).

	γ-tocoferol (mg/g) ¹	α-tocoferol (mg/g) ¹	TF total (mg/g) ¹²
Advasterol ester ®	0,342 ± 0,061	0,068 ± 0,010	0,408 ± 0,172

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (n = 5)

² Tocoferoles (TF) totales expresados como la suma de tocoferoles (α- y γ-) individuales.

En la **Tabla 29A** puede verse que el AG mayoritario en la composición de los FEE fue el ácido linoleico (AL; C18:2 n-6), seguido por el ácido oleico (18:1 n-9 c). Las concentraciones de AG poliinsaturados (AGPI), esto es, con tres o más insaturaciones, resultaron muy bajas en comparación a las de los AG monoinsaturados y diénicos. En base a estos perfiles se pudo estimar un valor de índice AGPI o índice de peroxidación de 0,68 (ecuación 1). Según la metodología expresada por Mocking et al. (2012), se puede estimar este índice como la relación ponderada entre los distintos ácidos grasos con tres o más insaturaciones con respecto a la concentración total de ácidos grasos [$C_{T(AG)}$]:

$$Indice\ AGPI = \frac{(0,025 \cdot AG_{Mono}) + (1 \cdot AG_{Di}) + (2 \cdot AG_{Tri}) + (4 \cdot AG_{Tetra})}{C_{T(AG)}} \quad (1)$$

donde AG_{Mono} , AG_{Di} , AG_{Tri} y AG_{Tetra} son las concentraciones respectivas de ácidos grasos (AG) con una, dos, tres y cuatro insaturaciones.

El índice AGPI o de peroxidación resulta de utilidad para predecir la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales y, por lo tanto, estimar la vida útil de los productos que contienen AGPI. Por eso es importante tener en cuenta que, al agregar los FEE (Advasterol ester®) al queso como producto final, se aporta una importante cantidad de sustancias vulnerables a la oxidación, esto es, los AGPI (**Tabla 29A**), los cuales podrían comprometer la estabilidad oxidativa del producto final. Al mismo tiempo, esta presencia de AGPI enriquecería al queso en su calidad “funcional” ya que, el enriquecimiento en AGPI es beneficioso para la salud (McClements & Decker, 2000; Corzo et al., 2020; Domínguez-Díaz et al., 2020), por lo cual es necesario estabilizarlos en el producto obtenido.

Ningtyas et al. (2019) observaron que el agregado de fitoesteroles en su forma esterificada para obtener quesos “crema” funcionales aumentaba muy significativamente el contenido de AG del producto desarrollado. A su vez, determinaron que la producción de hexanal y heptanal, flavors esenciales del queso tipo crema fermentado, generalmente producidos por una ligera oxidación de los AG no saturados, alcanzaban mayor concentración cuando los fitoesteroles eran agregados como FEE al queso crema funcional desarrollado. Tal como ocurre con los FEL, los FEE reducen también la absorción del colesterol en el intestino, resultando en la disminución del nivel de LDL transportadoras del colesterol (Tan et al., 2020).

En la **Tabla 29B**, puede observarse que el contenido de grasa total obtenido a partir de la muestra de FEE es de aproximadamente un 40%. Además de los AGs que componen esa grasa, es importante este resultado ya que debemos considerar que, al realizar el ensayo con esta preparación comercial, además de aportar un porcentaje considerable de grasa a la preparación, este valor debe contemplarse a la hora de realizar los cálculos de masa a agregar de FEE. Como es una preparación comercial, no hay en bibliografía datos de referencia. Sin embargo, en algunas publicaciones, diversos autores elaboran productos análogos de queso o bien productos funcionales con agregado de fitoesteroles esterificados y emulsificados. En ellos se documentan cantidades agregadas mayores a las que finalmente tienen los productos finales obtenidos (Guiney et al., 2016; Gies et al., 2019).

En la **Tabla 29C**, puede observarse que la concentración de TF totales es de aproximadamente 0,40 mg, de los cuales el aporte mayoritario está dado por el γ - (0,342 mg) seguido por el α - (0,068 mg). Ambos datos, se encuentran dentro de los rangos encontrados en bibliografía (Ergönül & Köseoğlu, 2014; Grilo, 2014). De todos modos, los autores de los trabajos citados concluyen que una cantidad significativa de tocoferol presente en los aceites crudos se pierde durante los procesos de refinado, especialmente cuando el proceso es físico, en contraposición al refinado químico. Parámetros como la presión y la temperatura también contribuyen a la retención de este tipo de compuestos. Por ejemplo, un proceso de refinado a baja temperatura y alta presión puede contribuir a retener los TF (Ergönül & Köseoğlu, 2014). Además, cabe recordar que los FEE son una preparación comercial constituida por FEL provenientes del deodestilado del aceite de soja, los que se encuentran esterificados con ácidos grasos de colza, con lo que la comparación y la revisión de datos en bibliografía se realizaron en base a aceites crudos por no encontrar productos similares.

5.4.3. Ensayo de desempeño de los fitoesteroles (FE). Fitoesteroles en crema y leche emulando la adición al tanque pulmón (etapa 1)

Como se mencionó previamente, en las diferentes formulaciones comerciales los fitoesteroles pueden estar libres o asociados con diferentes compuestos que favorecen su incorporación a las diferentes matrices alimenticias. Es por esta razón que surgió la necesidad de realizar pruebas de desempeño con las tres alternativas (sección 4.3):

- i) los fitoesteroles esterificados (FEE) Advasterol éster®.
- ii) los fitoesteroles libres (FEL) Advasterol 90®.
- iii) los fitoesteroles emulsificados (FEEM) Emulfit AE 3675®.

El primer punto crítico consistió en probar la adición de cada una de estas tres formulaciones en cada una de las dos matrices propuestas. La primera matriz fue leche fluida estandarizada al 1,9% p/v de grasa (cruda, sin homogeneizar ni pasteurizar, tal como se la utiliza corrientemente en la industria para la elaboración del queso “Por Salut” *light*) y crema de leche (48% p/p de grasa) proveniente de los mismos lotes de leche cruda. La alternativa de adición a crema de leche tiene que ver con la afinidad de los fitoesteroles por la fase lipídica de los alimentos y con la posibilidad de concentrarlos para luego agregarlos en un paso previo a la cuajada (**Fig. 20**).

Como se mencionó anteriormente, tanto los FEE como los FEEM, a diferencia de los FEL tienen en su composición compuestos que aportan peso pero que no son fitoesteroles. Tomando como punto de partida los FEL y suponiendo que los mismos queden retenidos en su totalidad en la matriz, se agregaron concentraciones de 2,20 g en 100 mL de crema o leche. Pero además se probaron formulaciones agregando 2,75 g (25% más) y 3,30 g (50% más) en 100 mL de crema o de leche. El mismo criterio se siguió para realizar las formulaciones con los FEE y los FEEM, pero partiendo de la base de que los primeros aportan un 40% de grasa (**Tabla 29B**), mientras que los segundos un 50% de emulsificantes (sección 4.3).

Se reportan las distintas concentraciones ensayadas y los tiempos de mezclado necesarios para lograr una mezcla homogénea tanto en la leche 1,9% grasa (**Tabla 30**) como en la crema (**Tabla 31**).

Tabla 30. Concentraciones¹ de fitoesteroles ensayadas en la leche (1,9% de grasa).

FEE ² (g/100 mL de leche)	0	3,67	4,60	5,50
Tiempo de mezclado (min.)	0	2	2	2
FEEM ³ (g/100 mL de leche)	0	4,40	5,50	6,60
Tiempo de mezclado (min.)	0	4	8	13
FEL ⁴ (g/100 mL de leche)	0	2,20	2,75	3,30
Tiempo de mezclado (min.)	0	4	10	15

¹Las concentraciones de fitoesteroles corresponden a su rendimiento teórico en fitoesteroles libres en el producto, considerando que los FEE contienen 40% de AG y los FEEM 50% de emulsificante.

²Fitoesteroles esterificados Advasterol éster®.

³Fitoesteroles emulsificados Emulfit AE 3675®.

⁴Fitoesteroles libres Advasterol 90®.

Tabla 31. Concentraciones¹ de fitoesteroles ensayadas en la crema de leche (48% de grasa).

FEE ² (g/100 mL de leche)	0	3,67	4,60	5,50
Tiempo de mezclado (min.)	0	2	2	2
FEEM ³ (g/100 mL de leche)	0	4,40	5,50	6,60
Tiempo de mezclado (min.)	0	4	8	13
FEL ⁴ (g/100 mL de leche)	0	2,20	2,75	3,30
Tiempo de mezclado (min.)	0	4	10	Desest.

¹Las concentraciones de fitoesteroles corresponden a su rendimiento teórico en fitoesteroles libres en el producto, considerando que los FEE contienen 40% de AG y los FEEM 50% de emulsificante.

²Fitoesteroles esterificados Advasterol éster®.

³Fitoesteroles emulsificados Emulfit AE 3675®.

⁴Fitoesteroles libres Advasterol 90®.

Desest.: Desestabilización. Corte de la emulsión.

En las mezclas realizadas con FEE (Advasterol éster®) se pudo observar la formación de pequeñas gotas oleosas, bien distribuidas, tanto en la leche como en la crema (**Fig. 37**), mostrando un aspecto homogéneo, ligeramente coloreado de amarillo, presentando un mejor desempeño cualitativo que los mostrados por FEEM (Emulfit AE 3675®) y FEL (Advasterol 90®). Por el contrario, tanto los FEL (**Fig. 38**) como los FEEM (**Fig. 39**) no se disolvieron, sino que permanecieron suspendidos o dispersos en ambas matrices, llegando a la formación de grumos y de precipitado a todas las concentraciones ensayadas, presentando dificultades al momento del mezclado (**Fig. 38**).

La desestabilización de la matriz se observó tanto en la leche como en la crema. Sin embargo, en la leche no alteró su viscosidad mientras que en la crema se observó una

desestabilización de la grasa, sobre todo en las concentraciones más elevadas, alcanzando inclusive el punto de “corte” de la crema (**Tabla 31**). Este problema se observó tanto en la crema no pasteurizada de la empresa CDS (**Fig. 38**) como en una preparación con crema comercial (**Fig. 37**). Este fenómeno podría deberse a la desestabilización de los glóbulos de grasa por la incorporación “forzada” de una cantidad excesiva de lípidos a la matriz láctea (Granger et al., 2003; Guinee, 2011).

Los ensayos precedentes permitieron seleccionar la preparación comercial de fitoesteroles más adecuada para continuar las pruebas de incorporación de los FE en la matriz. De este modo se utilizaron los FEE (Advasterol éster®) como punto de partida para pasar a las pruebas de la etapa laboratorio y piloto.

Nagarajappa et al. (2018) fortificaron leche fluida (3% grasa) con fitoesteroles, incorporando para ello una preparación comercial (42,38% de β -sitosterol, 24,81% de estigmasterol, 26,73% de campesterol, 1,84% de brassicasterol) a la manteca fundida, usando DATEM (diacetil ésteres mono y diglicéridos del ácido tartárico) como emulsificante (6,5% de la emulsión), formándose así una emulsión aceite en agua. El sistema resultante (10% de fitoesteroles) fue agitado en baño a 120°C para que se incorporaran los fitoesteroles. Esta emulsión fue luego agregada a la leche (3% de grasa, 8,5% de sólidos no grasa), homogeneizando a 60°C, calentando luego a 75°C por 15 s y finalmente enfriando y almacenando a 4°C. De acuerdo a los autores, la leche fortificada con fitoesteroles fue no significativamente diferente a la leche control sin fitoesteroles desde el punto de vista sensorial. Además fue física y sensorialmente estable por 7 días de almacenamiento en refrigeración.

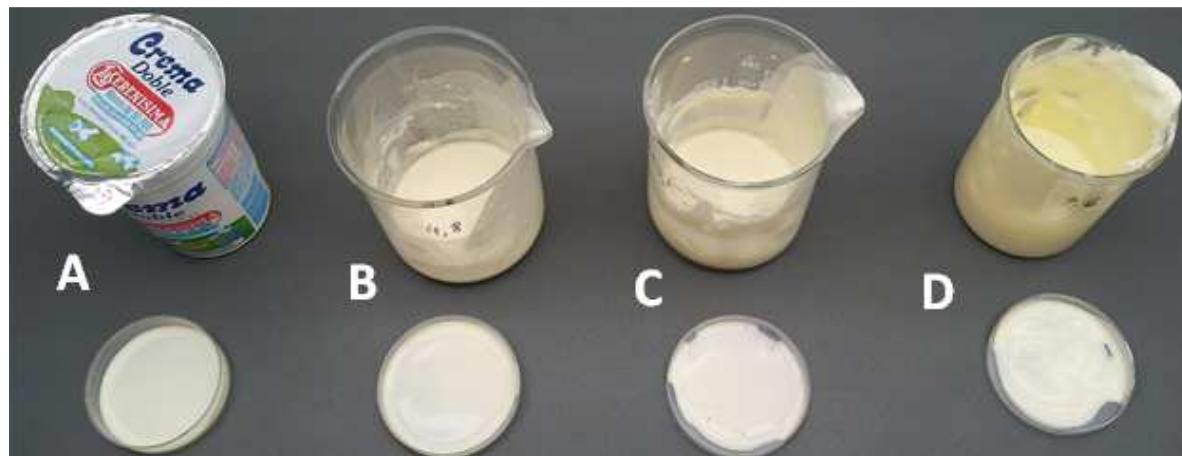


Figura 37. Aspecto de las mezclas con crema de leche comercial de distintas concentraciones de Advasterol éster® (FEE, fitoesteroles esterificados): 0% (**A**); 3,67% (**B**); 4,60% (**C**); 5,50% (**D**).

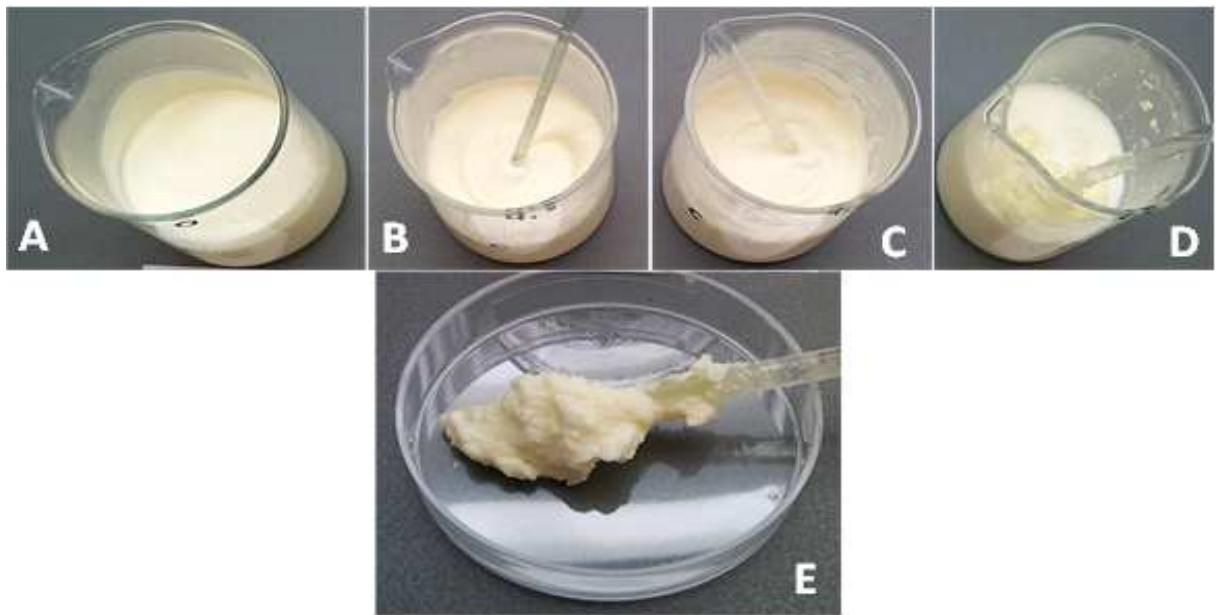


Figura 38. Aspecto de las mezclas con crema de leche CDS S.A. de distintas concentraciones de Advasterol 90® (fitoesteroles libres; FEL): 0% (A); 2,20% (B); 2,75% (C); 3,30% (D, E).

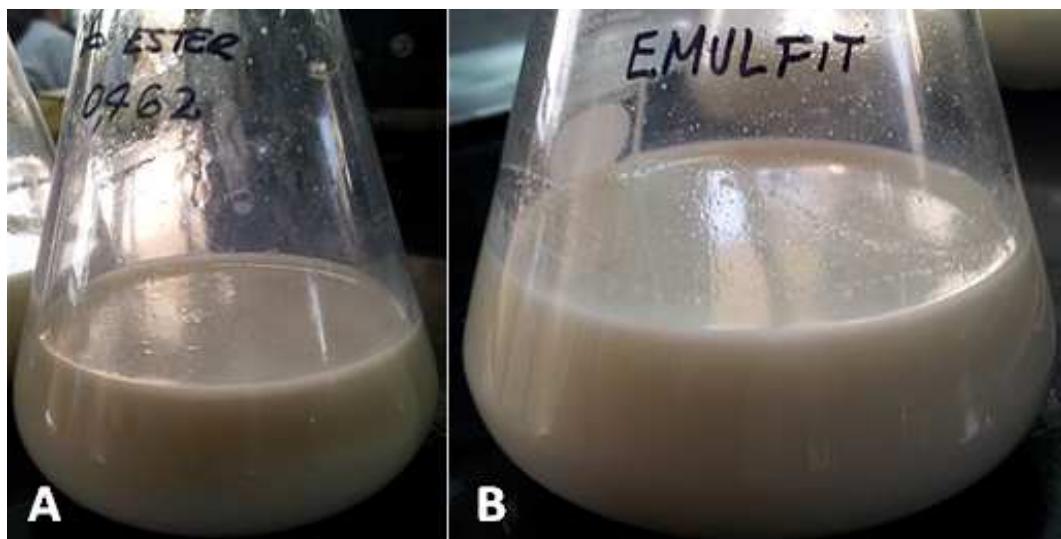


Figura 39. Aspecto de las mezclas con leche de los fitoesteroles esterificados (FEE, Advasterol éster ®) (A) y de los fitoesteroles emulsificados (FEEM, Emulfit AE 3675®) (B).

5.5. Elaboración de queso “Por Salut” *light* con fitoesteroles a escala laboratorio

5.5.1. Composición química de las leches crudas y estandarizadas al 1,9 % y 1 %

Para elaborar quesos “Por Salut” *light* según el protocolo utilizado en la empresa láctea fue necesario en primer lugar estandarizar, a escala laboratorio, el valor de grasa de la leche en 1,9% (sección 4.7). De este modo, el queso descremado llega a una concentración final de grasa aproximada de entre el 17 y el 18%. En la **Tabla 32** se muestran los contenidos de grasa, proteínas y sólidos totales de la leche utilizada para las elaboraciones a escala laboratorio. La leche (grasa: 1,9% p/v) se utilizó tal cual para ser adicionada con los FEE mientras que, para la adición en la

crema de leche, la matriz fue descremada hasta alcanzar el 1% en grasa a fin de agregar luego la crema, completando el 0,9 % p/v restante.

Tabla 32. Contenidos de grasa, proteína y sólidos totales (g/100mL) en las leches.

	Leche cruda	Leche estandarizada 1,9%	Leche estandarizada 1%
Grasa	3,69 ^c	1,89 ^b	1,03 ^a
Proteína	3,35 ^a	3,51 ^b	3,52 ^b
Sólidos totales	12,08 ^b	11,75 ^{ab}	11,20 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$).

No se observaron diferencias significativas en los contenidos de proteínas ni de sólidos totales al finalizar el proceso de descremado, pero sí se observaron las diferencias significativas esperables en el contenido de grasa.

5.5.2. Elaboración de los quesos a escala laboratorio

Para la elaboración de los quesos a escala laboratorio se utilizó leche proveniente del tambo de la misma estación experimental, fresca, de buena calidad higiénico-sanitaria tal cual lo especifica el Código Alimentario Argentino (Artículo VIII) (pH: 6,6 – 6,7; acidez: 14-16 °D; recuento de bacterias totales $\leq 10^6$ UFC/mL; recuento de células somáticas: 400.000 células/mL). Esta leche fue estandarizada según **Tabla 32**. En tanto, los fermentos y el cloruro de calcio (sección 4.3) fueron exactamente los mismos a los utilizados habitualmente en la elaboración de quesos blandos a escala industrial, en las dosis ajustadas al volumen de fabricación. Con respecto al cuajo, se utilizó el preparado enzimático líquido a base de la proteasa quimosina (100%) mencionado en la sección 4.3.

La caseína, proteína cargada negativamente en su superficie debido a la κ -caseína cuando el pH es naturalmente superior a su punto isoeléctrico (pH 4,6) tal como se da en la leche, resulta ser coagulada debido a la acción de la quimosina (coagulante o cuajo; sección 4.3) agregada y debido además a la ayuda simultánea de la acidez generada por el *starter* o fermento (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; sección 4.3) agregado. La quimosina (EC 3.4.23.4) es una peptidasa con una amplia especificidad de sustrato. Es específicamente conocida por su capacidad para coagular la leche al escindir el enlace $\text{Fen}^{105}\text{-Met}^{106}$ de la κ -caseína, liberando el glicomacropéptido. La eliminación de esta cadena hidrofílica desde la superficie de la κ -caseína, permite que las micelas de caseína (diámetro medio 0,04 a 0,2 micrones) se asocien, en presencia de iones calcio, principalmente por interacciones hidrofóbicas, formando una red o *network* tridimensional continuo y estable que retiene a los glóbulos de grasa (diámetro medio 2 a 10 micrones) y al resto de los componentes (Jensen et al., 2013). La quimosina es esencial en la producción de quesos firmes. Por otro lado, la acidez generada por el *starter* o fermento contribuye a la agregación de las micelas de caseína debido a la neutralización de las cargas negativas superficiales. Los iones calcio, aquí agregados como cloruro de calcio (sección 4.3), además, contribuyen a la adhesión entre las

micelas (Horne & Banks, 2004). La adición de calcio reduce el tiempo de coagulación del cuajo de la leche debido a que los iones neutralizan las cargas negativas superficiales de la caseína, lo que favorece la agregación de las micelas. La adición de bajas concentraciones de calcio también aumenta la firmeza del gel (Lucey & Fox, 1993; Choi et. al., 2007).

Una vez estandarizada la materia prima (**Tabla 32**), se procedió a la elaboración de quesos de 100 g, según el protocolo para producción del queso blando.

Para producir quesos a escala laboratorio se realizaron las adiciones de los FEE en leche (FEEL) o en crema (FEEC) a las tres concentraciones evaluadas, esto es, 3,67 %, 4,60 % y 5,50 %, para así determinar el comportamiento (**Tablas 30 y 31**).

Durante la elaboración se realizó el monitoreo de parámetros tales como el tiempo y la temperatura de coagulación y el peso de los quesos luego de la inmersión en salmuera, reportándose los resultados en la **Tabla 33**. Los mismos mostraron que la adición de FEE a la crema (FEEC) o a la leche (FEEL) no modificó los tiempos de coagulación (tc) ni la temperatura de coagulación (TC) y los valores se mantuvieron dentro de los esperados.

Tabla 33. Parámetros¹ obtenidos de los quesos Por Salut *light* producidos a escala laboratorio y con las concentraciones de fitoesteroles esterificados (FEE) indicadas, tanto en leche (FEEL) como en la crema (FEEC): tiempo de coagulación (tc) de la cuajada, temperatura de coagulación de la cuajada (TC) y peso de los quesos luego de la inmersión en salmuera.

Concentración		tc (min)	TC (°C)			Peso (g)		
Control (0%)	C	10,08 ± 0,02	37,20	± 0,14	94,79	± 0,20		
3,67%	3,67 FEEL	11,02 ± 0,20	37,11	± 0,14	101,01	± 0,11		
3,67%	3,67 FEEC	9,20 ± 0,20	37,26	± 0,15	104,90	± 0,11		
4,60%	4,60 FEEL	9,96 ± 0,10	37,36	± 0,11	97,41	± 0,20		
4,60%	4,60 FEEC	8,98 ± 0,02	37,12	± 0,11	97,40	± 0,14		
5,50%	5,50 FEEL	8,61 ± 0,20	37,09	± 0,15	99,52	± 0,11		
5,50%	5,50 FEEC	9,71 ± 0,05	37,12	± 0,14	101,59	± 0,10		

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (*n* = 3).

En la **Figura 40A** se presentan las curvas de disminución del pH registradas durante la acidificación de las cuajadas en la producción del queso a escala laboratorio.

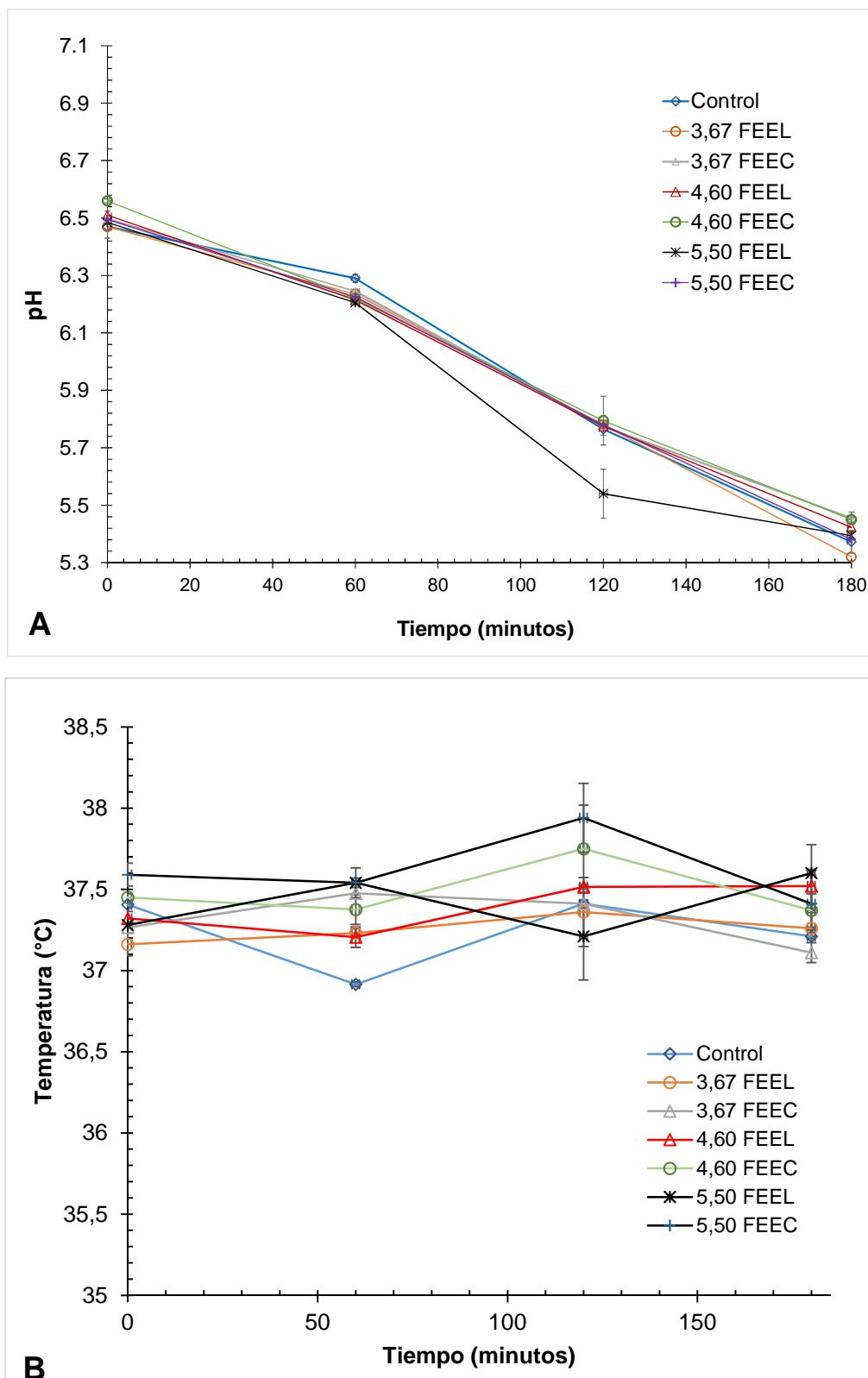


Figura 40. Curvas de descenso del pH ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$) registradas en el queso de cada lote experimental (valor promedio de réplicas) (A). Registro de temperatura de la masa durante el proceso (B). Las barras indican el desvío estándar ($n = 3$).

Estas mediciones se realizaron a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ una vez por hora durante un lapso de tres horas (**Fig. 40**). La leche tiene normalmente un pH entre 6,5 y 6,8 a 25°C debido a la presencia de los ácidos láctico y cítrico (Negri, 2005). En el momento en que la masa de los quesos es descargada a la mesa de moldeo y por propia gravedad es bajada a los moldes, se toma el primer valor de pH (tiempo 0) (**Fig. 40A**). En condiciones ideales, desde que se toma ese valor de pH (tiempo 0) hasta que se logran valores de pH de alrededor de 5,3-5,2 no deben transcurrir más de 3-3,5 horas. Todos los lotes, presentaron curvas de descenso de pH normales, salvo el punto a los 120 minutos de la elaboración para 5,50 FEEL, en el cual hubo un descenso mayor del pH, solamente a ese tiempo (**Fig. 40A**). A escala de laboratorio hubo pequeñas diferencias entre los lotes analizados, aunque éstas no fueron determinantes del resultado final. En todos los sistemas que se presentan en la **Figura 40A**, la velocidad de descenso del pH fue de $0,384 (\pm 0,012)$ unidades de pH/h. El descenso del pH se debe a la actividad de las bacterias lácticas aportadas por el fermento o *starter* (sección 4.3), las cuales son fermentadoras de la lactosa, aumentando en consecuencia la concentración de ácido láctico (Negri, 2005). Debido a ello, la disminución del pH es otro factor tecnológico que prueba que la enzima coagulante permaneció activa en el fermento (Jacob et al., 2010).

La quimosina, enzima coagulante usada en el presente trabajo (sección 4.3), es más estable a valores de pH entre 5,3 y 6,3 (Jensen et al., 2013), rango que se observa en la curva de descenso del pH reportado en la **Figura 40A**. En condiciones ácidas (pH 3-4), la enzima pierde su actividad rápidamente, probablemente causada por autodegradación. La quimosina sufriría una rápida pérdida de la actividad cuando la temperatura aumenta de 45 a 55°C (Jensen et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, la temperatura de incubación debe ser mantenida dentro de los $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para que las bacterias lácticas (*starters*) acidifiquen a velocidades correctas la masa del queso. Si la temperatura no es controlada adecuadamente dentro de los valores óptimos de trabajo de los *starters*, las velocidades de acidificación se verán afectadas, repercutiendo en las características físico-químicas, estructurales y organolépticas del producto final (Johnson, 2017). En la **Figura 40B**, se muestra la evolución de las temperaturas registradas simultáneamente al pH. Para el caso de la elaboración control (C), la temperatura descendió por debajo de los 37°C ($36,5^{\circ}\text{C}$) a los 60 minutos, lo cual frenó la fermentación, mientras que para la elaboración 5,50 FEEC, a los 120 minutos se produjo un incremento de la temperatura por encima de los 37°C ($38,3^{\circ}\text{C}$), acelerando la acidificación (**Fig. 40B**). No obstante, el seguimiento del proceso logró ajustar la temperatura en los puntos siguientes, haciendo que el fermentado continuara dentro de los parámetros normales. Cabe recordar que la masa de queso a obtener en estas elaboraciones es de aproximadamente 100 g. Una vez obtenida la cuajada y realizado el desuerado, debido al pequeño volumen de cuajada resultante resultó difícil para estos casos realizar los ajustes necesarios para controlar la temperatura con mínimas desviaciones.

En la **Figura 41** se presentan los niveles de FEL recuperados en los quesos. Los resultados de este ensayo mostraron que su recuperación de la matriz no presentó un incremento sustancial o significativo al incluir mayores cantidades de FEE. Por el contrario, parecería que el sistema tiende a saturarse cuando los FEE se adicionan en concentraciones superiores al 3,66 %. Tampoco se alcanzó la concentración objetivo de FEL en el producto final de 2,20 g/60 g de queso, según lo establecido por EFSA (2010) (**Fig. 41**). Este resultado fue determinante para la continuación de los ensayos a escala piloto e industrial.

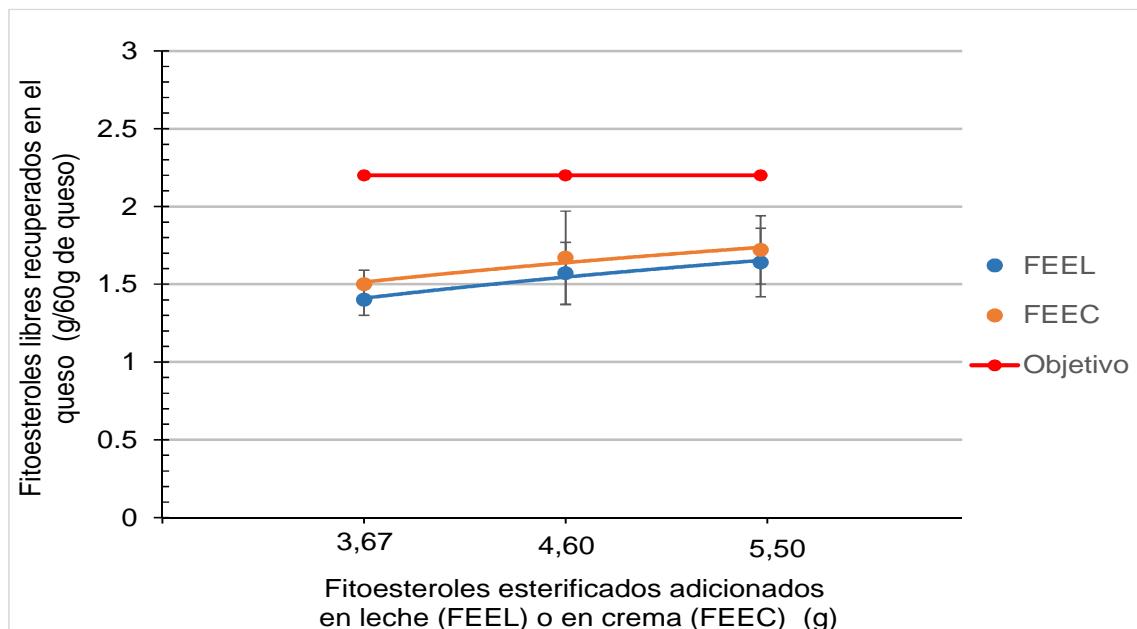


Figura 41. Contenido de FEL en quesos producidos a escala laboratorio (g / 60 g de queso). Se muestra la concentración objetivo en rojo. Las barras de error indican el desvío estándar ($n = 3$).

En definitiva, no se logró una mayor incorporación de FEE al queso al agregar más cantidad ($p>0,05$). De este modo se fijó otro de los parámetros del sistema a ser considerado en las elaboraciones a escala piloto e industrial.

En la **Figura 42**, se muestran los niveles de tocoferoles propios del sistema (TF totales, suma de los isómeros α y γ) en cada concentración y condición de agregado de los FEE.

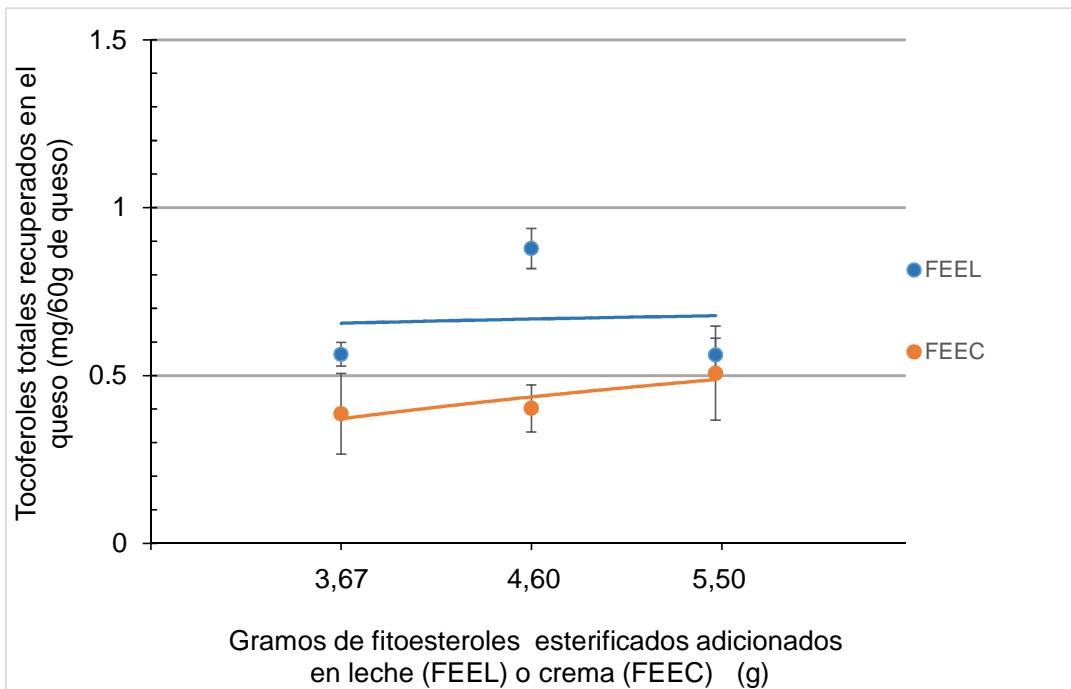


Figura 42. Niveles de tocoferoles (isómeros α y γ) totales recuperados en los quesos producidos a escala laboratorio por las metodologías FEEL y FEEC (fitoesteroles esterificados agregados en la leche o en la crema, respectivamente). Las barras indican el desvío estándar ($n = 3$).

Los TF (Fig. 42) mostraron un comportamiento similar al de los fitoesteroles (Fig. 41). El sistema parecería saturarse con TF a la menor concentración de FEE ensayada. Este resultado es esperable porque los TF son también parte del excipiente de la formulación de FEE comercial (Advasterol éster®), siendo ambos liposolubles.

Ambas formas de adición (en leche directamente, FEEL, o en crema, FEEC, y posterior dilución) sirvieron para lograr la incorporación y posterior recuperación de los fitoesteroles en el queso finalmente obtenido. En cuanto a la adición en leche, la 4,60 FEEL (Tabla 14) sería la óptima para obtener el queso más enriquecido en TF.

Es evidente que a escala laboratorio y en las condiciones ensayadas (pasteurización en tina, mezcla manual y procedimientos realizados en vasos de precipitado) (sección 4.8), no se pudo lograr la incorporación de una cantidad mayor de FEE que sea recuperada en el queso.

Aparentemente, los FEE mostraron un mejor desempeño cuando fueron agregados a la leche que a la crema (Fig. 42). Esto podría explicarse porque los tocoferoles son relativamente polares y, por ello, se ubican en la interface aceite-agua de las membranas de los glóbulos de grasa (McClements & Decker, 2000; Ramiro-Cortijo, 2020). Al aumentar el nivel de FEE adicionado, la recuperación tanto de los fitoesteroles como de los tocoferoles no aumentó significativamente. Es más, de los resultados obtenidos parece que tanto la crema como la leche se saturan. De todos modos, sería necesario realizar estudios sucesivos para determinar si existe una verdadera saturación o si bien, por las dimensiones y volúmenes empleados, se dificulta la correcta adición. En base a esto, se decidió continuar los ensayos con la mínima dosis (3,67 gr FEE/100 mL de leche o crema) que permitía la máxima recuperación. De este modo aumenta la sostenibilidad del sistema

ya que si se agrega un exceso de FEE del 25 o 50%, esto se traduce en un costo significativo para la industria.

Si bien las cantidades de FEL recuperadas no fueron las deseadas (objetivo; **Fig. 41**), con este ensayo se pudo comprobar que el FEE adicionado fue transferido y recuperado luego de todo el proceso de fabricación del queso.

5.5.3. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala laboratorio: Valor peróxido

Una gran cantidad de productos primarios, peróxidos e hidroperóxidos, se forman en los aceites por autooxidación (**Fig. 10; Fig. 11**). El valor peróxido (VP) se puede utilizar como índice oxidativo para las primeras etapas de la oxidación de lípidos, habiéndose determinado que una mayor estabilidad oxidativa suele ir acompañada de un aumento más lento del valor peróxido (Saeed & Naz, 2019; Cong et al., 2020).

En la **Figura 43** se muestra el VP a tiempo inicial de los quesos producidos a escala laboratorio, en donde no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) por el agregado de fitoesteroles, como así tampoco diferencias entre las distintas concentraciones y formas de adición (FEEL y FEEC). Cabe señalar que algunos datos poseen mucha variabilidad (poco repetitivas) y tuvieron que ser descartados. A pesar de ello, se pudo comprobar que la adición de los compuestos no indujo oxidación de lípidos ($p>0.05$) (**Fig. 43**). Cabe destacar que este ensayo se realizó sólo a tiempo inicial, por lo cual dichos quesos no presentaron un grado de oxidación apreciable debido a la formación de hidroperóxidos.

Tanto los quesos con fitoesteroles como los quesos control (sin agregado de FEE) tuvieron valores de peroxidación menores a 1 mEq de O₂/kg de queso, independientemente de la concentración de FEE adicionada, lo cual concuerda con valores reportados en literatura para quesos de reciente elaboración (Karoui et al., 2007; Bergamaschi, 2018). De este modo, las diferencias en la composición química de los quesos no influyeron en la formación de hidroperóxidos en el producto fresco.

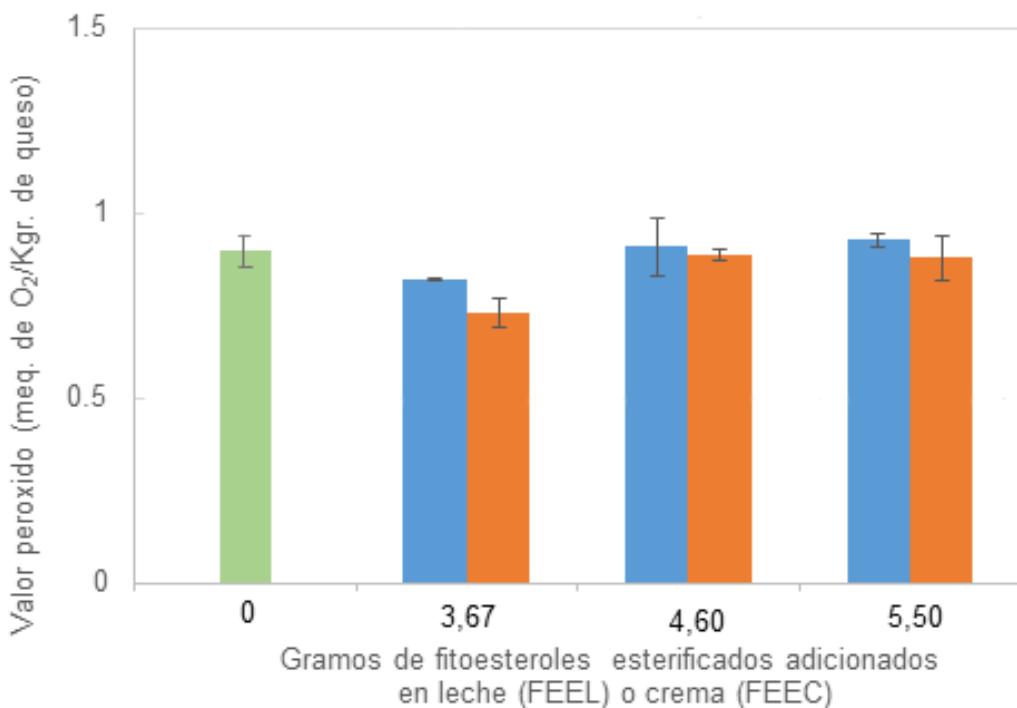


Figura 43. Valor peróxido determinado a tiempo inicial en quesos producidos a escala laboratorio: queso control (■) o sin fitoesteroles; quesos conteniendo fitoesteroles esterificados (FEE) que fueron inicialmente agregados en la leche (■FEEL) o en la crema (■FEEC). Las barras indican el desvío estándar ($n = 3$).

5.5.4. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala laboratorio: TBARS

Tal como fuera previamente mencionado, esta es otra técnica indicadora de oxidación lipídica. La hidroperoxidación lipídica genera, entre otros compuestos, MDA como molécula de “terminación” de la cadena de autoxidación (Schaich, 2016). El MDA es un producto secundario relativamente estable de la oxidación de los AGPIs (Amaral et al., 2018).

En este caso, y como se observa en la **Figura 44**, los resultados mostraron la misma tendencia que la formación de hidroperóxidos mencionada en el punto anterior (**Fig. 43**). La adición de fitoesteroles por las dos formas ensayadas, leche (FEEL) o crema (FEEC), y a las distintas concentraciones, no produjo un aumento en la oxidación lipídica de los productos frescos. Los valores observados en el queso fueron bajos para todos los casos (**Fig. 44**).

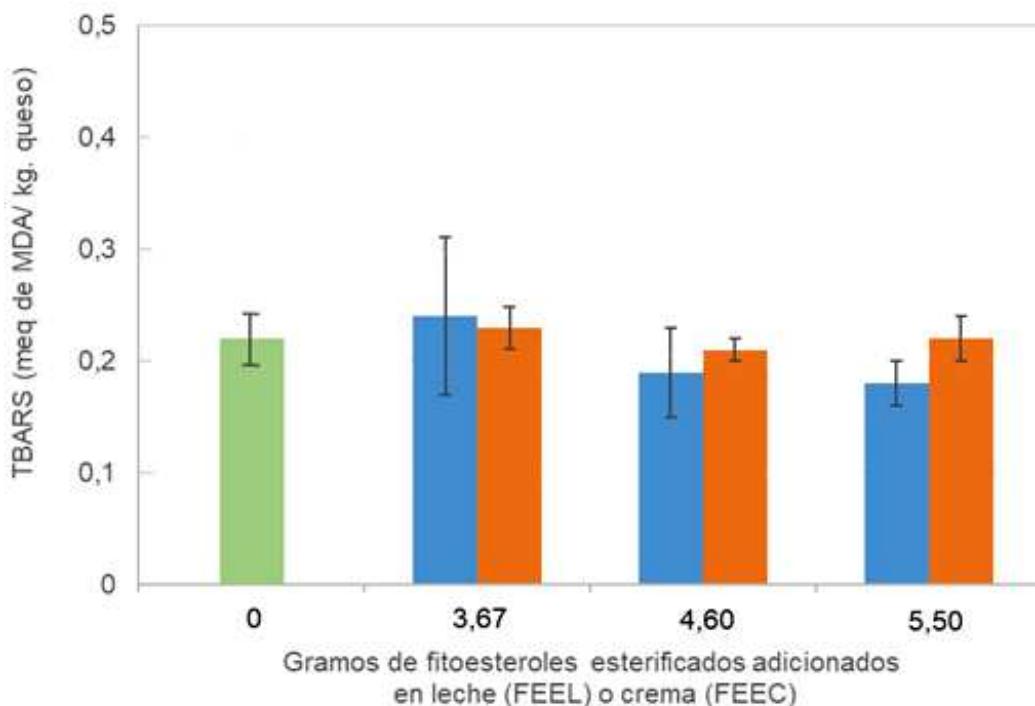


Figura 44. Niveles de oxidación por TBARS (mEq. MDA/kg queso) determinados a tiempo inicial en quesos producidos a escala laboratorio: queso control (■) o sin fitoesteroles; quesos conteniendo fitoesteroles esterificados (FEE) que fueron inicialmente agregados en la leche (■FEEL) o en la crema (■FEEC). Las barras indican el desvío estándar ($n = 3$).

5.5.5. Discusión y conclusiones de las etapas TRL 3 y 4

Se desarrollaron las técnicas analíticas por HPLC para la determinación de los FEL componentes del producto comercial (Emulfit AE 3675 ®, Advasterol ester ®, Advasterol 90®) en las diversas matrices (leche, crema y queso). Las técnicas resultaron ser satisfactorias, habiendo mostrado límites de detección de 5 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los fitoesteroles campesterol y estigmaesterol, y de 5 a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el β -sitoesterol. En estos rangos, la respuesta del equipo fue lineal. Además, las técnicas de extracción demostraron tener una excelente recuperación (>90%) en las diferentes matrices y en los productos comerciales proveedores de los FE.

Para el caso de los tocoferoles α y γ , del β -caroteno y del retinol, las técnicas cromatográficas ya estaban desarrolladas y puestas a punto en nuestro laboratorio para las matrices leche, crema y queso (Rosetti et al., 2015). La respuesta del equipo demostrada a través de las curvas de calibración fue adecuada en los rangos estudiados.

Los resultados expuestos mostraron la factibilidad de la detección y de la cuantificación de los fitoesteroles, de los tocoferoles α y γ , del β -caroteno y del retinol, así como de los productos de oxidación en las tres matrices lácteas ensayadas, leche, crema y queso.

El evento “INTA Expone” del año 2012 sirvió para definir, mediante el empleo de una encuesta de consumidores, sobre cuál producto de los dos posibles reducidos en calorías producidos por la empresa, queso Por Salut y queso mozzarella, se iban a llevar adelante los

trabajos de adición de los fitoesteroles, para así obtener un producto funcional. El queso Por Salut *light* fue el que resultó preferido por los consumidores.

Una vez realizado este primer testeo de preferencia, se comenzaron con los trabajos de desempeño de los FE en sus distintas presentaciones comerciales, esto es, FEL (Advasterol 90®), FEEM (Emulfit AE 3675®), dispersables fácilmente en matrices acuosas, y FEE (Advasterol éster ®), dispersables fácilmente en matrices lipídicas. De las tres presentaciones que se mencionaron, las dos primeras están constituidas por un polvo fino, mientras que la tercera opción (FEE) es una pasta viscosa blanco amarillenta, sólida a temperatura ambiente. A los tres productos se les cuantificó la concentración de fitoesteroles, mientras que a los FEE también se les determinó el perfil de ácidos grasos (**Tabla 29A**), resultando muy importante el aporte de AGPI (67,42% de ácido linoleico) y de un AG monoinsaturado (25,19% de ácido oleico). Si bien los AGs esterificantes de los FE colaboran para que estos compuestos sean afines a una matriz lipídica, aportan un peso significativo, el cual debe ser considerado a la hora de realizar la adición de los fitoesteroles en sí. Para el caso de los FEEM, el aporte de compuestos que no son esteroles resultó ser de, aproximadamente, un 50 %, mientras que, para el caso de los FEE, el contenido de AGs resultó ser del 40 %. Seguido a esto, con vistas al escalado del producto, se plantearon dos formas de adición de los FE, pudiendo ser en la crema o bien en la leche estandarizada al 1,9% p/v de grasa. Además, se evaluaron 3 niveles de adición: a) la concentración calculada para recuperar 2,2 g de FEL en el producto final (o sea, asumiendo que no se pierde nada durante la elaboración), b) la calculada con un 25 % y c) la calculada con un 50% por encima de la primera mencionada (a). Las presentaciones en polvo (FEL y FEEM) no se disolvieron, permaneciendo en suspensión en los medios ensayados. Además, produjeron la desestabilización de la crema en las concentraciones necesarias para su agregado y posterior reformulación. Los FEE (Advasterol éster®) en cambio, se incorporaron en la matriz de forma más homogénea, tanto en la crema como en la leche.

En los quesos Por Salut a continuación producidos a escala laboratorio (1 litro de leche) se logró la extracción y recuperación de FE y TF por las técnicas analíticas optimizadas en el presente trabajo, así como la determinación del perfil de ácidos grasos y también el análisis de compuestos de degradación oxidativa por medio de los ensayos de VP y de TBARS. Estos ensayos, sirvieron para observar el desempeño de cada una de las técnicas, mostrando que la recuperación de los FE y TF fue superior al 90% y que el agregado de los FEE impactó en el perfil de ácidos grasos de las mezclas realizadas.

Si bien las condiciones experimentales de elaboración del queso a escala laboratorio (1 litro de leche), con adición a niveles crecientes (**Tabla 14**) de FEE en crema o en leche, resultaron variables entre las elaboraciones a baja escala, se demostró que no fue necesario agregar fitoesteroles en exceso para recuperarlos mejor en el producto y, por otro lado, que si bien los FEE aportaron una mayor concentración de AGPI, ésta no se tradujo en un aumento inicial de la peroxidación lipídica del producto, esto es, como consecuencia del proceso.

5.6. Etapas TRL 5 y 6. Elaboración de queso “Por Salut” *light* con fitoesteroles a escala piloto

Para la elaboración de los quesos a escala piloto (180 litros) se utilizó el protocolo de elaboración de queso blando, bajo en grasa, desarrollado por el Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria de la Estación Experimental del INTA-Rafaela (Rafaela, provincia de Santa Fe). Este protocolo se adaptó de acuerdo al utilizado en la planta CDS S.A., para ajustarlo lo más posible a las condiciones industriales. La materia prima utilizada fue leche proveniente del tambo de la misma estación experimental, fresca, de buena calidad higiénico-sanitaria, de acuerdo al Código Alimentario Argentino (Artículo VIII) (pH: 6,6 – 6,7; acidez: 14-16 °D; recuento de bacterias totales $\leq 10^6$ UFC/mL; recuento de células somáticas: 400.000 células/mL). Los fermentos y el cloruro de calcio (sección 4.3) fueron exactamente los mismos a los utilizados habitualmente en la elaboración de quesos blandos a escala industrial, en las dosis ajustadas, mientras que el cuajo utilizado fue el mismo al empleado a escala laboratorio (sección 4.3), esto es, el preparado enzimático líquido de quimosina (100% pura). La formulación utilizada es la que se reporta en la **Tabla 15**, previamente presentada.

Al no haberse alcanzado la dosis objetivo en la etapa anterior (**Fig. 41**), se decidió continuar con la estrategia de adición de FEE a la crema (FEEC) para luego ser diluida en el producto final o directamente en la leche estandarizada al 1,9% (p/v) de grasa (FEEL).

Se realizaron dos (2) elaboraciones a escala piloto, compuestas de la siguiente manera:

- C: Queso control o sin agregado de FEE.
- FEEC: Queso funcional con agregado de los FEE (Advasterol éster®) en la crema.
- FEEL: Queso funcional con agregado de los FEE (Advasterol éster®) en la leche.

Vale la pena aclarar que las elaboraciones se realizaron en años diferentes y de cada elaboración se obtuvieron seis hormas de queso de aproximadamente 4 kg cada una.

5.6.1. Elaboración a escala piloto

Durante los ensayos a escala laboratorio, las concentraciones máximas de fitoesteroles alcanzaron valores de alrededor de 1,5 g FEL/60 g de queso, los cuales estuvieron por debajo del objetivo buscado de 2,2 g FEL/60 g de queso (**Fig. 41**), acorde con lo establecido por la EFSA (2010) para ejercer un efecto hipocolesterolémico.

En el caso de la escala piloto, el ajuste metodológico consistió en el aumento del volumen de leche y en la utilización de un pasteurizador de placas marca REDA® de 300 L/h de capacidad. Estas condiciones mejoraron la repetitividad del ensayo, debido ello a las condiciones más controladas de la mezcla y de la pasteurización y a los mayores volúmenes de quesos obtenidos. Los FEE fueron adicionados alternativamente a la leche (1,9 % p/v en grasa) o a la crema (48% p/p de grasa), para luego ser mezclados en el tanque auxiliar, previo a la pasteurización y al posterior llenado de la tina, con los fitoesteroles incorporados y pasteurizados.

Luego se continuó con el proceso de fabricación de los quesos Por Salut tal como se explica en el protocolo correspondiente.

5.6.1.1. Balance de masa

Para lograr la estandarización del producto y cumplir con las especificaciones del Código Alimentario Argentino, se calculó el balance de masa teniendo en cuenta la relación materia grasa/proteína establecida para el queso Por Salut *light* por la empresa, relación que permite elaborar quesos con un 25% menos de materia grasa que la del queso Por Salut regular (no *light*). Sin embargo, se debió tener en cuenta el ingreso al elemento de volumen de una nueva corriente, los FEE, quienes poseen un 40% de materia grasa (**Tabla 29B**), la cual se va a sumar a la grasa propia de la leche, pasando a formar parte del producto final, acarreando ello un aumento significativo en la proporción de materia grasa de la corriente de entrada al proceso.

A continuación se detalla el esquema del balance de masa del proceso de elaboración del queso Por Salut *light* funcional (**Fig. 45**), esto es, conteniendo los FEE, con sus respectivas ecuaciones presentadas en la **Tabla 34**. Si bien en el balance de masa se puede observar la corriente de tocoferoles, cabe destacar que para las elaboraciones a escala piloto no se los adicionó, mientras que, a escala industrial, la cantidad agregada (30 g) no aporta cantidades significativas de materia grasa, con lo cual, esta corriente se desprecia.

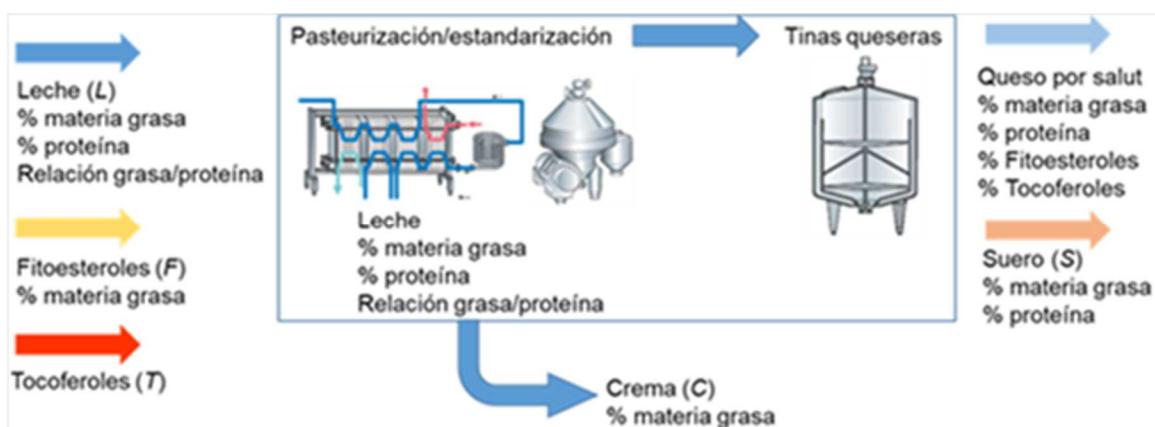


Figura 45. Esquema representativo del balance de masa del proceso de producción del queso Port Salut *light* funcional a escala piloto.

Tabla 34. Ecuaciones del balance de masa del proceso de elaboración del queso Por Salut *light* funcional a escala piloto.

Balance general	$L + F = Q + S + C \quad (2)$
Balance de materia grasa	$L * X_{MgL} + F * X_{MgF} = Q * X_{MgQ} + S * X_{MgS} + C * X_{MgC} \quad (3)$

L = flujo de leche (kg); F = flujo de fitoesteroles (kg); Q = flujo de queso (kg); S = flujo de suero (kg); C = flujo de crema (kg).

X es la fracción másica (kg) de materia grasa (Mg) en la leche (MgL), en los fitoesteroles (MgF), en el queso (MgQ), en el suero (MgS) y en la crema (MgC).

A su vez se realizó el balance de masa en el pasteurizador con el objetivo de determinar la cantidad de crema a extraer para cumplir con la normativa del Código Alimentario Argentino para productos *light* (Fig. 46), utilizando las ecuaciones de la **Tabla 35**.

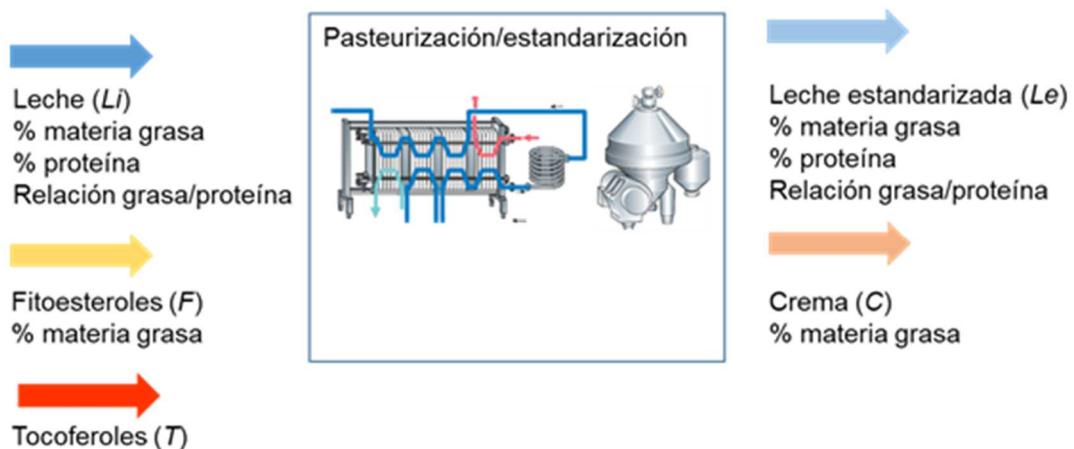


Figura 46. Balance de masa en el pasteurizador para el proceso de producción del queso Port Salut *light* funcional a escala piloto.

Tabla 35. Ecuaciones del balance de masa en el pasteurizador para el proceso de elaboración del queso Por Salut *light* funcional a escala piloto.

Balance general en el pasteurizador	$L_i + F = L_e + C \rightarrow L_e = L_i + F - C \quad (4)$
Balance de materia grasa	$L_i * X_{MgLi} + F * X_{MgF} = L_e * X_{MgLe} + C * X_{MgC} \quad (5)$

L_i = flujo de leche inicial (kg); F = flujo de fitoesteroles (kg); L_e = flujo de leche estandarizada (kg); C = cantidad de crema a extraer (kg). X es la fracción másica (kg) de materia grasa (Mg) en la leche inicial ($MgLi$), en los fitoesteroles (MgF), en la leche estandarizada ($MgLe$) y en la crema (MgC), expresada en gramos.

Del balance general del pasteurizador (ecuación 4) se despejó la corriente de leche estandarizada (L_e) y se la introdujo en la ecuación del balance de materia grasa (5) obteniendo así una única ecuación con una sola incógnita de la cual se calculó la cantidad de crema a extraer (C), como se detalla en la ecuación (6).

$$C = \frac{L_e * X_e - L_e * X_{Li} - F_{XLi} - F_{XF}}{X_{Li} - X_C} \quad (6)$$

Con el valor de materia grasa (Mg) de la leche y la relación materia grasa/proteína (Mg/P_{Leche}) deseada para obtener el queso Por Salut *light*, cuyo valor es 0,65 (**protocolo CDS S.A.**) se calculó, mediante la ecuación 7, la Mg "a estandarizar", esto es, la materia grasa buscada en la leche luego de la estandarización:

$$M_g \text{ (a estandarizar)} = P_{Leche} \cdot \left[\frac{M_g}{P_{Leche}} \right]_{a alcanzar} \quad (7)$$

Con los valores de todas las variables se determinó, con la ecuación 6, la cantidad de crema (C) a extraer.

En la **Tabla 36** se detalla el valor de cada una de las corrientes con los datos de la elaboración a escala piloto del queso Por Salut *light* funcional, esto es, con agregado de fitoesteroles y ya adicionado con α -tocoferol como aditivo antioxidante.

Tabla 36. Valores de cada corriente para las elaboraciones a escala piloto.

Detalle	Valor	Detalle	Valor
Materia grasa crema	76%	Materia grasa leche	3,64%
Kg leche en tina	186,5	Proteínas leche	3,42%
Kg fitoesteroles	1,3	Relación materia grasa/proteínas buscada	0,52
Materia grasa fitoesteroles	40,0%	Materia grasa a Estandarizar (ecuación 7)	1,9%
CREMA A EXTRAER	4,6 kg / 5,35 Litros (ecuación 6)		

5.6.1.2. Composición, pH y acidez de las leches crudas

A modo de rutina de trabajo, se realizó en las leches el estudio de la composición química y microbiológica. En la **Tabla 37** se muestran los resultados obtenidos en estas determinaciones para las leches crudas utilizadas en las elaboraciones.

Tabla 37. Composición¹ y propiedades químicas¹ de las leches utilizadas para las elaboraciones control (C) y con fitoesteroles esterificados (FEE) agregados en crema (FEEC) o en leche (FEEL).

	C	FEEC	FEEL	p
Grasa%	3,87 ± 0,2	3,63 ± 0,1	3,64 ± 0,3	NS
Proteína%	3,40 ± 0,1	3,44 ± 0,1	3,43 ± 0,2	NS
Sólidos Totales	12,90 ± 0,1	12,69 ± 0,3	12,67 ± 0,3	NS
pH	6,74 ± 0,1	6,75 ± 0,1	6,74 ± 0,2	NS
Acidez	18 ± 0,7	18 ± 0,7	18 ± 0,9	NS

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 2$). NS: no significativo ($p < 0,05$).

El análisis estadístico aplicado a los resultados muestra que no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la composición de los lotes de leche destinados a la elaboración de las diferentes variantes tecnológicas (control, FEEC y FEEL). Este resultado es esperable ya que, de haber existido diferencias en la materia prima, no se podrían haber comparado los resultados determinados en los quesos obtenidos.

Del mismo modo, se realizó el control de aptitud microbiológica de la leche de silo destinada a las elaboraciones a escala piloto. En la **Tabla 38** se muestran los resultados del análisis microbiológico, del recuento de células somáticas y del ensayo de antibióticos en las leches crudas. Los parámetros analizados mostraron que las leches se ajustaron a los valores recomendados en el Código Alimentario Argentino (Artículo VIII) para la elaboración de productos lácteos.

Tabla 38. Análisis microbiológico: recuento de células somáticas y ensayo de antibióticos en las leches crudas destinadas a la elaboración del queso sin agregado de fitoesteroles (control, C) y con fitoesteroles esterificados agregados en la crema (FEEC) o en la leche (FEEL).

	C	FEEC	FEEL	p
Coliformes (UFC/mL)	190	150	140	NS
Mesófilos (UFC/mL)	26.000	26.000	18.000	NS
Recuento de células somáticas (cel./mL)	310.000	273.000	308.000	NS
Antibióticos (Kit Eclipse 50)	negativo	negativo	negativo	

NS: no significativo.

En un siguiente paso, las leches fueron ajustadas a un contenido de grasa total del 1,9% p/v para la elaboración de los quesos descremados control (C) y del funcional con fitoesteroles adicionados a través de la leche (FEEL). La leche destinada a los quesos en los cuales el agregado de FEE se realizó en la crema (FEEC), se la estandarizó al 1% p/v de grasa (**Tabla 39**).

Tabla 39. Parámetros¹ de las leches luego de la estandarización y prueba de coagulación del producto en la tina quesera: sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados (FEE) agregados en crema (FEEC) o en leche (FEEL).

	C	FEEC	FEEL	p
Leche cruda				
Grasa%	1,94 ± 0,2	1,00 ± 0,1	1,99 ± 0,1	NS
Proteínas%	3,43 ± 0,1	3,39 ± 0,1	3,39 ± 0,1	NS
Sólidos Totales	11,29 ± 0,3	11,25 ± 0,3	11,24 ± 0,5	NS
Relación G/P	0,57	0,29	0,59	NS
Leche en tina²				
tc (min)	8,30 ± 0,3	7,90 ± 0,2	8,70 ± 0,2	NS
Tc (°C)	37,8 ± 1,3	37,5 ± 1,7	37,8 ± 1,1	NS
pH coagulación	6,69 ± 0,2	6,68 ± 0,2	6,69 ± 0,3	NS

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (n = 3). NS: no significativo (p<0,05).

G/P: relación grasa-proteína

tc: tiempo de coagulación.

Tc: temperatura de coagulación.

²Luego de la adición de cuajo y fermentos.

Los resultados que se presentan en la **Tabla 39** muestran que tanto la leche control como la leche destinada a la adición de fitoesteroles (FEEL) se mantuvieron dentro de los parámetros

esperados para leches destinadas a la elaboración de quesos descremados. Las diferencias entre los tratamientos se deben a las diferentes condiciones de descremado necesarias para la adición de FEE en leche o en crema.

El tiempo de coagulación (tc), la temperatura de coagulación (Tc) y el pH de coagulación (**Tabla 39**) se mantuvieron dentro de los parámetros normales, siendo de alrededor de 8 min, 37,7 °C y de 6,7, respectivamente.

5.6.1.3. Aspecto de los quesos obtenidos a escala piloto

Durante la elaboración de queso a partir de FEEC (FEE adicionados a través de la crema) se observó que, una vez que la cuajada se vertía en los moldes y comenzaba el desuero, el suero quedaba con un exceso de grasa en la parte superior (**Fig. 47**). El efecto se evidenció por las gotas de grasa blancuzcas que no se incorporaron a la masa que forma la cuajada.



Figura 47. Corte de cuajada en la elaboración FEEC (fitoesteroles esterificados adicionados a la crema). Se observan las pequeñas gotas de grasa blancuzcas que forman un puntillado superficial en el suero amarillo.

La incorporación no resultó homogénea. Este fenómeno podría ser atribuido a la falta de homogeneidad en la reestructuración de la matriz leche-crema. Al mezclar la crema con fitoesteroles al volumen de leche descremada necesaria para elaborar el queso se producía la desestabilización de la emulsión, de lo cual resultaba un queso poco homogéneo, que se manifestó al formarse la horma en el proceso de desuero en los moldes (**Fig. 48**). Aparentemente, la parte más lipofílica (crema) migraría hacia el centro de la horma durante el proceso de desuero,

dejando en el centro una mayor concentración de materia grasa que contiene los FEE (centro de aspecto amarillento).



Figura 48. Aspecto cualitativo del queso formado a partir de leche reestructurada con fitoesteroles adicionados a la crema (FEEC).

Por otra parte, cuando los fitoesteroles fueron adicionados directamente a la leche descremada (FEEL), no se observaron las gotas de grasa en la superficie de la cuajada (**Fig. 49**). A su vez, los quesos obtenidos a partir de esta cuajada mostraron una horma de mayor homogeneidad (**Fig. 50**) que cuando los fitoesteroles fueron agregados a la crema (**Fig. 48**).



Figura 49. Corte de cuajada de elaboración del queso a escala planta piloto a partir de la leche con fitoesteroles adicionados (FEEL).



Figura 50. Queso obtenido a escala piloto a partir del agregado de los fitoesteroles a la leche descremada (FEEL).

5.6.1.4. Evolución del pH de los quesos de todas las elaboraciones

En la **Figura 51** se presentan las curvas de descenso del pH de los quesos provenientes de los tres tratamientos. Como se mencionó anteriormente, de cada elaboración se obtuvieron seis hormas de queso de aproximadamente 4 kg cada una, y cada medición es el promedio de tres determinaciones de pH en sitios distintos de la horma.

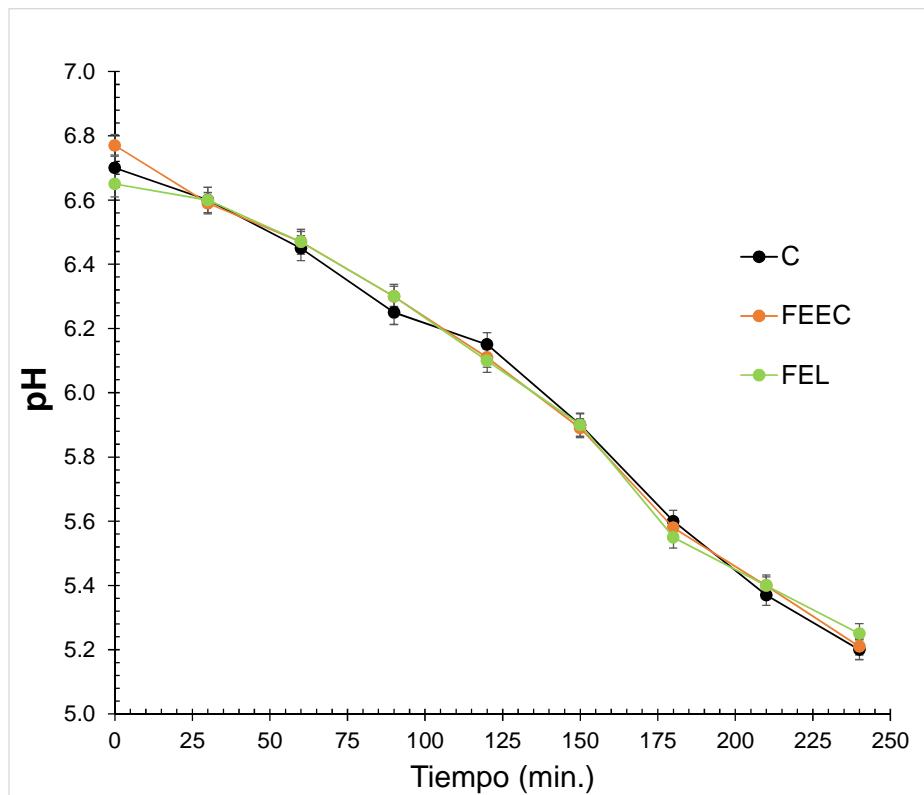


Figura 51. Curvas de descenso del pH para los tres tratamientos (37,7°C) en la producción a escala planta piloto: sin agregado de fitoesteroles o control (C), con fitoesteroles esterificados agregados a la leche (FEEL) o a la crema (FEEC). Las barras indican el desvío estándar ($n = 3$).

Como se observa en la **Figura 51**, las curvas de acidificación fueron similares entre los tratamientos y se ajustaron al tipo de curvas esperadas para el queso *Por Salut light*. Estos resultados coincidieron con las curvas de descenso del pH de los quesos obtenidos a escala laboratorio (**Fig. 40A**), aunque a escala piloto (**Fig. 51**) se observa la uniformidad de los resultados. Además, mostraron nuevamente que la adición de los FEE tanto sea en leche como en crema no influyó en el proceso de acidificación.

Para los sistemas que se presentan en la **Figura 51**, la velocidad de descenso del pH a escala de elaboración planta piloto fue en promedio de 0,39 ($\pm 0,01$) unidades de pH/h, si es que se fuerza un ajuste lineal de los resultados. Esta velocidad es igual a la calculada en los sistemas de la **Fig. 40A** para la elaboración a escala laboratorio, donde sí se observó un ajuste lineal muy significativo ($p<0,001$), lo cual en este caso (**Fig. 51**) ya no ocurre. En la **Fig. 51** ya se ve un descenso ligeramente curvo del pH, lo que implica que, en la elaboración a escala piloto se ralentiza este proceso.

En la leche y el queso, el buffer prevalente es el fosfato, encontrándolo como fosfato de calcio (Johnson, 2002). Esta sal tiene un papel importante en la coagulación de la leche por el cuajo y en la estructura del queso (Lucey & Fox, 1993; Choi et al., 2007). En la leche, los buffers actúan relativamente rápido capturando los iones H_3O^+ . Solamente cuando la concentración de H_3O^+ liberados excede la habilidad del buffer para retenerlos, el pH global del sistema disminuye. El efecto amortiguador o buffer puede tomar unos días en ocurrir y detectarse en el caso del queso, en el cual la evolución del pH dependería de cómo el queso fue elaborado. En este producto, la caída del pH es una carrera entre la cantidad de H_3O^+ producidos y la cantidad de H_3O^+ amortiguados por el buffer (Johnson, 2002). Así, en el queso mozzarella, esta carrera es ganada por la rápida tasa de producción de ácido. En consecuencia, el pH puede disminuir rápidamente sólo para aumentar más tarde cuando el efecto amortiguador del fosfato de calcio finalmente se activa y captura los iones H_3O^+ . Luego se observa un aumento del pH. Sin embargo, en el queso Cheddar, donde hay una cantidad considerable de ácido formado durante el prensado e inclusive durante el almacenamiento, la cantidad de H_3O^+ liberados excede la cantidad que puede ser captada por el fosfato de calcio. Así, en realidad, el pH puede disminuir. No aumenta hasta mucho más tarde durante la maduración, pero entonces lo hace como producto de otras reacciones químicas (Johnson, 2002).

La cantidad de fosfato de calcio en el queso está directamente relacionada con el pH al que se coagula la leche y el pH en el drenaje. Cuanto más bajo es el pH en estos puntos, menos fosfato de calcio permanece en la cuajada, lo que lleva a menos tamponamiento en el queso. De hecho, un método probado y verdadero para hacer un queso ácido implica aumentar la concentración de lactosa o drenar a un pH bajo. Como consecuencia de la proteólisis, se forma amonio (NH_4^+) y el pH, entonces, aumenta. Esto último también ocurre cuando el ácido láctico ($p\text{Ka} = 3,86$ a 20°C) formado es metabolizado en ácidos mucho más débiles (Johnson, 2002).

5.6.1.5. Composición y propiedades de los quesos

En la **Tabla 40** se muestra la composición y características fisicoquímicas de los quesos obtenidos a escala piloto. Estas determinaciones, también se llevaron a cabo en el Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria de la EEA-INTA Rafaela (prov. de Santa Fe). Los quesos obtenidos se caracterizaron por una humedad del 51-52 %, un contenido de grasa que aumentó del 16,58 al 19,03 % con el agregado de los FEE a la crema (FEEC) y a la leche (FEEL), mientras que el contenido de proteína fue de \approx 24%. El pH del producto estuvo en torno a 5,4. De acuerdo al contenido de humedad (**Tabla 40**), el queso Por Salut es del tipo de alta humedad (46-54%; Secretaría de Agroindustria, 2015) y por el contenido de grasa (**Tabla 40**) se trata de un tipo de queso magro (10 a 24,9%) (Secretaría de Agroindustria, 2015).

Tabla 40. Composición¹ y propiedades químicas¹ de los quesos obtenidos a escala planta piloto: sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados agregados ya sea en la crema (FEEC) o en la leche (FEEL).

	C	FEEC		FEEL					
Humedad ²	52,42 ^{ab}	\pm	1,2	51,34 ^a	\pm	1,1	52,02 ^{ab}	\pm	1,1
Grasa ²	16,58 ^a	\pm	1,4	18,80 ^b	\pm	1,4	19,03 ^c	\pm	1,2
Proteína ²	25,21 ^{ab}	\pm	1,3	23,26 ^a	\pm	1,2	24,27 ^{ab}	\pm	1,4
pH	5,41 ^{ab}	\pm	0,2	5,36 ^{ab}	\pm	0,2	5,41 ^{ab}	\pm	0,3
NaCl ³	1,06 ^a	\pm	0,1	1,52 ^b	\pm	0,2	1,68 ^b	\pm	0,2
Rendimiento ⁴	9,69 ^a		10,8 ^{ab}		11,3 ^{ab}				

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 3$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

² g/100g queso.

³ mg/100g queso.

⁴ kg de queso/100 L de leche.

El contenido de NaCl aumentó del 1,06 % (424 mg de sodio/100 g) en el queso control al 1,52 (608 mg de sodio/100 g) y 1,68% (672 mg de sodio/100 g) en los quesos donde los FEE fueron adicionados a la crema y a la leche, respectivamente, aún con sólo 1 hora de inmersión en salmuera (sección 4.4., punto 9: Salado). De esta manera, se observó una tendencia a obtener una mayor concentración de sal en los quesos adicionados con FEE ($p < 0,05$). Habría ocurrido entonces una facilitación de la difusión durante la inmersión en salmuera. Esta etapa no sólo agrega sabor al queso por el salado, sino que también ayuda a deshidratar la cuajada durante el escurrimiento al controlar la expulsión del suero y hacer que la cuajada se retraja. Sin embargo, la razón principal para salar el queso es inhibir a los cultivos de bacterias que continúan transformando la lactosa en ácido láctico (Guinee, 2004).

Para ser etiquetado como "bajo en sodio", un queso no debe contener más de 140 mg de sodio por cantidad de referencia y por 50 g (FDA, 2008). Por ejemplo, un queso procesado bajo en sodio debe tener menos de 280 mg de sodio/100 g de queso. Los quesos con mayor contenido de sodio (980 a 1375 mg de sodio/100 g de queso) incluyen el azul, el romano, el parmesano, el

roquefort y el feta. Los quesos con bajo contenido de sodio (350 a 475 mg/100 g de queso) incluyen la mozzarella suiza y fresca (Agarwal et al., 2011).

Como se reporta en la **Tabla 40**, después del agregado de FEE también se observó un incremento significativo ($p<0,05$) de los valores de grasa de las muestras analizadas. Como se mencionó anteriormente, los fitoesteroles se encuentran esterificados con ácidos grasos (**Tablas 29 A y B**) y es por ello esperable que produzca el incremento del valor de la grasa del queso (**Tabla 40**). De todos modos, y a pesar de las diferencias con respecto al queso control, el producto obtenido tiene un contenido de grasa que se encuentra en el rango considerado para su rotulado como queso *light* (quesos magros: cuando contengan entre 10,0 y 24,9% de grasa; CAA, Artículo 1376; Resolución Conjunta SPyRS N° 13/05, y SAGPyA N° 85/05)

Como puede verse en la **Tabla 40**, el rendimiento obtenido fue de 9,7-11,3 % (o kg de queso por cada 100 kg de leche utilizada). Pecora et al. (2013) informaron un rendimiento quesero a escala piloto de 9,3 kg/100 kg de leche o 9,3% en la producción de queso en barra Tybo.

5.6.1.6. Compuestos bioactivos en quesos

En las **Tablas 41 y 42** se presentan los resultados de los análisis correspondientes a los compuestos bioactivos en los quesos elaborados a escala piloto. El contenido de retinol varió entre 18 y 26 $\mu\text{g}/60\text{ g}$ de queso, mientras que el de β -caroteno lo hizo entre 2 y 14 $\mu\text{g}/60\text{ g}$ de queso (**Tabla 41**).

Tabla 41. Contenidos¹ (mg/60g de queso) de retinol, β -caroteno, γ - y α -tocoferol (TF) y de tocoferoles (TF) totales en los quesos “Por Salut” *light* sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados (FEE) agregados ya sea en la crema (FEEC) o en la leche (FEEL).

	C		FEEC		FEEL	
Retinol	0,018 ^a	\pm 0,005	0,035 ^{bc}	\pm 0,005	0,026 ^{ab}	\pm 0,003
β -Caroteno	0,011 ^{bc}	\pm 0,002	0,014 ^{ab}	\pm 0,002	0,009 ^a	\pm 0,002
γ -tocoferol	0,014 ^a	\pm 0,006	0,290 ^b	\pm 0,022	0,354 ^{ca}	\pm 0,027
α -tocoferol	0,068 ^a	\pm 0,015	0,098 ^b	\pm 0,021	0,136 ^{bc}	\pm 0,021
TF total	0,082 ^a	\pm 0,020	0,377 ^b	\pm 0,041	0,485 ^{bc}	\pm 0,046

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 3$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Los isómeros α y γ del TF son compuestos de origen vegetal que tienen capacidad antioxidante en las matrices lipídicas y en las interfaces lipofílicas-hidrofílicas. En quesos elaborados a partir de leche de origen pastoril, se obtuvieron concentraciones de TFs totales de aproximadamente 0,25 mg/60 g de producto (Rossetti, 2015). Los quesos con fitoesteroles del presente trabajo tuvieron niveles un poco más elevados de TFs que los esperables debido a que éstos forman parte además de la formulación comercial de FEE utilizada y, por lo tanto,

contribuirían a la actividad antioxidante para la preservación de los quesos durante la maduración (**Tabla 41**).

Tabla 42. Contenido¹ de fitoesteroles libres (FEL) en los quesos “Por Salut” *light* producidos a escala piloto y obtenidos sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados (FEE) agregados ya sea en la crema (FEEC) o en la leche (FEEL).

	C	FEEC	FEEL
Fitoesteroles libres (FEL) (g/60 g queso)	ND	1,38 ^a ± 0,31	2,75 ^b ± 0,38

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 3$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

ND: no detectable.

Los resultados de la **Tabla 42** mostraron que la adición de FEE a la leche (FEEL) resultó ser la vía más efectiva para alcanzar la incorporación final en el queso. Se logró así la concentración objetivo buscada como funcional (2-3 g/60 g de queso) (**Fig. 41**), en concordancia con lo establecido por la EFSA (2010) para tener efecto hipocolesterolémico. No ocurrió lo mismo para la adición en la crema y posterior reincorporación (FEEC), en la cual la dosis obtenida en el queso producido (**Tabla 42**) fue similar a aquella alcanzada a escala laboratorio (**Fig. 41**), y significativamente menor a la de los quesos FEEL (1,38 g versus 2,75 g/ 60 g; $p < 0,05$) (**Tabla 42**). Este resultado coincide con la observación empírica de la pérdida de materia grasa en el proceso de cuajada que se observó durante la elaboración de los quesos FEEC (**Fig. 47**). Si bien por la metodología de medición de grasa total no se evidenció la pérdida de grasa (**Tabla 41**), esta pérdida de FEE de casi 50% (**Tabla 42**) no es deseable para la industria, ya que aumentaría significativamente los costos de producción industrial.

5.6.1.7. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala piloto: Valor Peróxido

Como se explicó en la Introducción, los peróxidos son el primer producto estable indicador de oxidación y están relacionados con los productos secundarios medidos como TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Sin embargo, en presencia de antioxidantes de ruptura de la cadena de oxidación, podrían generarse hidroperóxidos sin la presencia de productos de oxidación secundarios. Por eso, las metodologías de análisis son complementarias y deberían mostrar una correlación positiva (Shahidi & Zhong, 2015; Domínguez et al., 2019).

En la **Tabla 43** se presentan los resultados del VP obtenidos a partir de los quesos Por Salut producidos a escala planta piloto. Este análisis se llevó a cabo a los 7 y 21 días de elaboración.

Tabla 43. Valor peróxido¹, expresado en mEq de O₂/kg de queso Por Salut *light*, determinados a los 7 y 21 días de su elaboración a escala planta piloto. Quesos obtenidos sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados (FEE) agregados ya sea en la crema (FEEC) o en la leche (FEEL).

	C	FEEC	FEEL
Día 7	0,23 ^a ± 0,001	0,34 ^b ± 0,006	0,42 ^c ± 0,004
Día 21	0,43 ^a ± 0,003	0,53 ^b ± 0,004	0,48 ^c ± 0,004

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

Se puede ver que, del análisis estadístico, los controles presentaron valores más bajos de oxidación (p<0,05) frente a las elaboraciones con FEE. Se observó un leve aumento de la oxidación lipídica en todos los quesos, pero éste fue más evidente en los quesos funcionales a los 21 días de maduración. Esto puede ser debido al mayor contenido de AGPI en el queso funcional, aportados ellos por los FEE agregados (**Tabla 29A**). Este resultado estaría indicando que los antioxidantes endógenos del queso, propios de la leche, y también aquellos acarreados por los FEE agregados (**Tabla 41**), no alcanzarían para impedir la reacción de inicio de la oxidación lipídica.

Sin embargo, los valores obtenidos son menores a los reportados como indicadores del deterioro. En general los productos frescos suelen tener un valor peróxido menor a 1 mEq O₂/kg (Gunstone, 2010), de modo que la calidad de los quesos no se vería comprometida en estos tiempos de madurado (**Tabla 43**).

5.6.1.8. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala piloto: TBARS

Como se discutió en la sección anterior, la inclusión de FEE en cantidades significativas podría disminuir la estabilidad oxidativa de los quesos funcionales obtenidos debido a la mayor concentración de compuestos susceptibles a la oxidación lipídica (**Tabla 29A**). En la **Tabla 44** se presentan los resultados de TBARS obtenidos en los diferentes quesos a los 7 y 21 días posteriores a la elaboración a escala planta piloto. Se observó igual tendencia que la mostrada por los valores peróxido (**Tabla 43**), esto es, una mayor concentración de TBARS en los quesos conteniendo fitoesteroles esterificados (FEE).

Tabla 44. Valores de TBARS¹ de los quesos “Por Salut” *light*, determinados a los 7 y 21 días de su elaboración a escala planta piloto. Quesos obtenidos sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados (FEE) agregados ya sea en la crema (FEEC) o en la leche (FEEL).

	C	FEEC	FEEL	p
Día 7	0,063 ^a ± 0,013	0,091 ^b ± 0,028	0,136 ^{bc} ± 0,052	*
Día 21	0,080 ^a ± 0,044	0,142 ^b ± 0,026	0,102 ^{bc} ± 0,025	*

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05 *).

Como se observó en los quesos a escala laboratorio (**Fig. 44**), hubo diferencias significativas ($p<0,05$) en los valores iniciales de TBARS entre el control (C) y los quesos elaborados con FEE (**Tabla 44**). Estas diferencias se mantuvieron a los 21 días de madurado de los quesos, mostrando que la adición de FEE efectivamente influyó sobre la estabilidad oxidativa del producto. Sin embargo, los valores finales de TBARS obtenidos son inferiores a los reportados para otros quesos similares (Kristensen et al., 2001; Mahmoodani et al., 2018).

5.6.2. Discusión y conclusiones de las elaboraciones a escala piloto: Etapas TRL 5 y 6

El objetivo principal de la elaboración a escala piloto fue el de producir quesos Por Salut *light* funcionales, verificar la factibilidad de la elaboración ya sea con los fitoesteroles esterificados (FEE) adicionados en crema (FEEC) o en leche (FEEL) y, una vez producidos, evaluar la concentración alcanzada de los fitoesteroles (FE), estudiando, además, la estabilidad oxidativa mediante las determinaciones del valor peróxido y del MDA (ensayo de TBARS). Además, evaluar el nivel de tocoferoles por su importancia como preservador natural antioxidante.

Se elaboraron quesos Por Salut *light* con agregado de FEE en hormas de aproximadamente 4 kg. El agregado de FEE no modificó los tiempos de coagulación (tc), las temperaturas de coagulación (TC) (**Tabla 39**) ni las velocidades de acidificación (**Fig. 51**), con lo cual, además, puede inferirse que los microorganismos utilizados habitualmente para la elaboración de este tipo de queso (sección 4.3) no fueron afectados. A escala piloto, se contó con equipamiento semi-industrial que permitió realizar los agregados de FEE ya sea en crema (FEEC) o en leche (FEEL) antes de la pasteurización.

Al comparar las dos formas de adición de FEE, esto es en crema (FEEC) o en leche (FEEL), se obtuvo una mejor recuperación de FE y, además, de TF antioxidantes cuando los FEE fueron agregados en la leche (FEEL). Cuando los FEE fueron agregados a la crema, ésta se desestabilizó, provocando que parte de la mezcla precipitara, formándose una capa de grasa en la parte superior de los gránulos de queso en la tina. Este efecto de desestabilización fue más evidente al momento del corte de la cuajada, tal como se observa en la **Figura 47**, originando un producto heterogéneo que, como consecuencia, no garantizaba la existencia de la misma concentración de FEE en las distintas zonas de la misma horma de queso (**Fig. 48**).

En el caso de la adición directa a leche descremada (FEEL), los quesos obtenidos mostraron un aspecto macroscópico uniforme, con una matriz homogénea, lográndose quesos Por Salut *light* con el grado de incorporación deseado (**Fig. 50**), en este caso, de 2,75 g de fitoesteroles libres cada 60 g queso (**Tabla 42**).

Probablemente, el equipo pasteurizador de placas REDA®, su configuración y sus bombas sanitarias industriales, imparten turbulencias y velocidades al líquido bombeado que resultaron beneficiosas para la incorporación de la mezcla FEEL y no tanto en la crema (FEEC), perdiéndose en esta última aproximadamente un 50% de los fitoesteroles (**Tabla 42**).

La recuperación de antioxidantes endógenos del queso (α y γ -tocoferol) también fue significativamente ($p<0,05$) mayor en el caso de FEEL que en quesos obtenidos de FEEC (**Tabla 41**).

El efecto del agregado de los FEE también se vio reflejado en los micronutrientes analizados. Para ambas elaboraciones piloto se observó un incremento en ambos isómeros del tocoferol (α y γ). En tanto, compuestos como el retinol y el β -caroteno se mantuvieron prácticamente sin variación (**Tabla 41**). Estos micronutrientes son importantes desde el punto de vista de la conservación del producto y de la salud. Ambos fueron encontrados también en los quesos control (**Tabla 41**) ya que provienen de la alimentación del ganado lechero (Rossetti, 2015).

En cuanto a la estabilidad oxidativa de los quesos ensayados (VP y TBARS), las elaboraciones con fitoesteroles serían algo más susceptibles a la oxidación que los quesos control (**Tablas 43 y 44**), debido ello a las insaturaciones de los ácidos grasos utilizados para la esterificación de los fitoesteroles (FEE) (**Tabla 29A**). Sin embargo, a los 21 días de madurado estos valores fueron relativamente bajos para todos los tratamientos y no representaría un defecto tecnológico (**Tablas 43 y 44**).

De este modo, se determinó la factibilidad de la elaboración de quesos funcionales a partir de la adición de FEE directamente a la leche descremada, ya que los resultados de recuperación de los compuestos bioactivos fueron óptimos (2,75 g/60 g queso; **Tabla 42**) y representa menor costo de proceso que si se realiza la mezcla previamente en la crema para luego reestructurar el producto.

5.7. Etapas TRL 6 a 8. Elaboración de queso “Por Salut” *light* con fitoesteroles a escala industrial

Se realizaron cinco elaboraciones a escala industrial de quesos Por Salut *light* con agregado de FEE (noviembre 2013, marzo 2014, agosto 2014, abril 2015 y octubre 2016) en la planta industrial CDS-Lácteos Capilla del Señor. La formulación utilizada es la que se reporta en la **Tabla 16**, previamente presentada. Corresponde decir que el diagrama de las elaboraciones y la serie de análisis realizados a los quesos obtenidos siempre fue el mismo. De esta manera se acordó realizar siempre una elaboración de queso Por Salut *light* sin la adición de FEE (Control) y luego una elaboración de queso Por Salut *light* con la adición de FEE (Funcional) en la leche (FEEL). Además, a fin de estudiar y cuidar cada detalle, estas dos elaboraciones fueron las últimas del día.

5.7.1. Balance de masa

Luego de realizar el balance de masa del proceso a escala industrial de acuerdo a las ecuaciones reportadas en las **Tablas 34 y 35**, con los valores de todas las variables se determinó la cantidad de crema (C) a extraer utilizando para ello la ecuación (6), tal como fuera explicado. En la **Tabla 45** se detalla el valor de cada una de las corrientes con los datos de la elaboración a escala industrial del queso Por Salut *light* funcional, esto es, con agregado de fitoesteroles y adicionado con alfa-tocoferol como aditivo antioxidante.

Tabla 45. Valores de cada corriente para las elaboraciones a escala industrial.

Detalle	Valor	Detalle	Valor
Materia grasa crema	76%	Materia grasa leche	3,59%
Kg leche en tina	3204,2	Proteínas leche	3,12%
Kg fitoesteroles	18	Relación materia grasa/proteínas buscada	0,65
Materia grasa fitoesteroles	40,0%	Materia grasa a Estandarizar (ecuación 7)	2,03%
CREMA A EXTRAER	80,0 kg / 92,0 Litros		
	(ecuación 6)		

5.7.2. Composición, pH y acidez de las leches crudas

Al igual que para los casos anteriores, fue imprescindible conocer la composición y propiedades físico-químicas de las leches crudas utilizadas para las elaboraciones a escala industrial. En la **Tabla 46** se observa que no hubo diferencias significativas entre la composición química, pH y acidez de las leches utilizadas en las cinco elaboraciones.

Tabla 46. Composición¹ y propiedades¹ físico-químicas de las leches utilizadas para las elaboraciones a escala industrial del queso Por Salut *light* ya sea sin agregado de fitoesteroles (control) y con agregado de fitoesteroles esterificados (funcional).

	Control	Funcional	p
Grasa%	3,73 ± 0,2	3,70 ± 0,3	NS
Proteína%	3,15 ± 0,1	3,15 ± 0,2	NS
Sólidos Totales	12,80 ± 0,3	12,67 ± 0,3	NS
pH	6,40 ± 0,2	6,70 ± 0,1	NS
Acidez	16,00 ± 0,2	16,00 ± 0,3	NS

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$).

NS: no significativo ($p < 0,05^*$).

Además, se realizó el ensayo de aptitud microbiológica, mostrándose los resultados en la **Tabla 47**. Allí podemos ver que el recuento de células somáticas y el ensayo de antibióticos en las leches crudas utilizadas en cada una de las elaboraciones están dentro de lo establecido en el Código Alimentario Argentino, resultando así ser leches aptas para elaborar productos lácteos que se ajustan a la normativa vigente.

Tabla 47. Composición microbiológica, recuento de células somáticas y test de antibióticos de las leches crudas utilizadas en las elaboraciones a escala industrial del queso Por Salut *light* sin agregado de fitoesteroles (control) y con agregado de fitoesteroles esterificados (funcional).

	Control	Funcional	<i>p</i>
Coliformes (UFC/ml)	150	150	NS
Mesófilos (UFC/ml)	20.000	18.000	NS
RCS (cel./ml)	305.000	308.000	NS
Antibióticos (Kit Eclipse 50)	negativo	negativo	---

NS: no significativo ($p<0,05$ *).

Una vez establecida la calidad de la materia prima se realizó, según el protocolo de fabricación, la estandarización de la leche. En la **Tabla 48** se muestran los parámetros analizados en las leches luego de su estandarización, para ambos lotes, control y funcional. Se presentan los resultados de la grasa estandarizada, proteínas y sólidos totales de las leches utilizadas para las elaboraciones. Los valores no presentan variaciones significativas ($p<0,05$) siendo ellas aptas y acordes en su composición para la elaboración de este tipo de queso. Además, se presentan los resultados de tiempo de coagulación (tc), temperatura de coagulación (Tc) y de pH de coagulación. Estos valores se encuentran dentro de lo normal (Protocolo de la empresa CDS S.A.). Estos datos fueron obtenidos promediando los resultados de las elaboraciones realizadas a escala industrial durante 5 años, lo cual llevó a que se obtuvieran tiempos de coagulación iguales ($tc=4$ min) a pesar de haberse obtenido diferentes pH de coagulación (**Tabla 48**).

Tabla 48. Parámetros de las leches luego de la estandarización y prueba de coagulación.

	Control	Funcional	<i>p</i>
Grasa %	1,93 \pm 0,2	1,92 \pm 0,1	NS
Proteínas %	3,13 \pm 0,1	3,29 \pm 0,2	NS
Sólidos Totales	11,39 \pm 0,3	11,35 \pm 0,3	NS
Relación G/P	0,62	0,59	---
tc (min)	4,00 \pm 0,3	4,00 \pm 0,2	NS
Tc (°C)	37,9 \pm 0,7	38,1 \pm 0,2	NS
pH coagulación	6,32 \pm 0,2	6,58 \pm 0,2	NS

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$).

NS: no significativo ($p<0,05$ *).

G/P: relación grasa/proteína.

tc: tiempo de coagulación.

Tc: temperatura de coagulación

Haciendo especial mención al parámetro tc , si bien entre las elaboraciones industriales no hubo variaciones significativas ($p<0,001$) (**Tabla 48**), comparando con la escala piloto (**Tabla 39**) se observó la disminución a la mitad ($p>0,001$) del tiempo de coagulación (tc) en las elaboraciones efectuadas a escala industrial. Esta diferencia podría atribuirse al uso de cuajo de diferentes proveedores comerciales. Tal como se explica en la sección 4.3, para las elaboraciones en las distintas escalas se usó como cuajo quimosina 100%, pero en aquél usado para las de escala laboratorio y piloto se declara una fuerza de cuajada de 700 IMCU (*International Milk-Clotting Units*) por mL, mientras que para aquel usado a escala industrial se alega una fuerza de cuajada ≥ 600 IMCU/mL.

Como se mencionó anteriormente, el presente desarrollo, se realizó en varios años, con lo cual, si bien se trató de mantener los mismos ingredientes, para el caso del cuajo no se pudo conseguir el mismo que se había utilizado para los ensayos de laboratorio y piloto. Además, la coagulación de la leche es influenciada por factores tales como las variaciones estacionales que afectan la calidad de la leche, la adición de soluciones de cloruro de calcio, las variaciones de pH o de acidez, la presencia de agentes inhibidores en la leche (ejemplo: cloro), la composición de la leche, la temperatura, entre otros factores (Moschopoulou et al., 2011; Manuelian et al., 2020).

Evidentemente, el uso de diferentes marcas tuvo consecuencias importantes a la hora de la elaboración. Si este tiempo de proceso se minimiza, es una ventaja para la producción. Para el caso de la elaboración de quesos con FEE, el agregado de grasa exógena contribuye a la inestabilidad del sistema, tal como ocurrió en la elaboración a escala piloto (ver sección 5.6.1.3.). La principal limitación de las emulsiones de este tipo (O/W) es su alta inestabilidad debida a la separación de fases por la flocculación de las gotas o fase dispersa (Paximada et al., 2021).

Al agregar el cuajo a la leche se forma un gel del cual se expulsa líquido (suero), porque el gel (cuajada) se contrae. En condiciones de reposo, un gel de este tipo puede perder hasta el 90 % de su volumen en determinadas condiciones (Fagan et al., 2017). El gel puede ser considerado como dos espacios continuos interpenetrantes, uno de los cuales consiste en la matriz de paracaseína y la otra de suero. Una vez que el preparado enzimático (cuajo) es agregado a la leche, es fácil detectar el comienzo de la proteólisis ya que la presencia de flóculos se observa a simple vista. A partir de este punto se toma el tiempo de coagulación del cuajo (*rennet coagulation time* o RCT) (Horne et al., 2017). Para la mayoría de los quesos, este tiempo debe transcurrir en reposo, y determina las características físicoquímicas propias del queso que se va a elaborar (Horne et al., 2017; Fagan et al., 2017). Durante este tiempo ocurre la desestabilización de la matriz, en donde las moléculas se reacomodan hacia otra forma más estable. El calcio añadido, presente entre la fase acuosa y coloidal, induce un aumento de la concentración de ión calcio, disminuyendo el contenido de fosfato inorgánico. A su vez, el fosfato de calcio coloidal permanece casi en equilibrio con el suero de la leche, mientras el pH del sistema disminuye, dando lugar al aumento de la velocidad de agregación de las caseínas (Klandar et al., 2007; Fagan et al., 2017). Es por esta razón que la reducción del tiempo de cuajada favorecería la retención de los FEE en la fracción

grasa, ya que un mayor tiempo de reposo de la leche durante la formación de la cuajada podría facilitar la precipitación de los FEE.

Esta dispersión se observó en las elaboraciones a escala piloto y se comprobó que es inestable, y se minimiza con el menor tiempo de reposo leche-cuajo. Disminuir este tiempo implica que, justamente, el período de reposo e inestabilidad también disminuya, evitando problemas de desestabilización de la dispersión.

5.7.3. Evolución del pH de los quesos de todas las elaboraciones

En la **Figura 52** se presentan las curvas de descenso del pH de los quesos elaborados a escala industrial. Este proceso ocurre dentro de los moldes plásticos (hormas de aprox. 4 kg) ubicados en estanterías dentro de la cámara de óreo a 37°C. Si bien las materias primas utilizadas para todas las elaboraciones tienen un pH promedio de 6,4 y 6,7 para las leches control y funcional, respectivamente, para la realización de este gráfico se utilizaron los valores correspondientes al promedio de los valores del pH de coagulación obtenidos en las elaboraciones realizadas a lo largo de 5 años (**Tabla 48**).

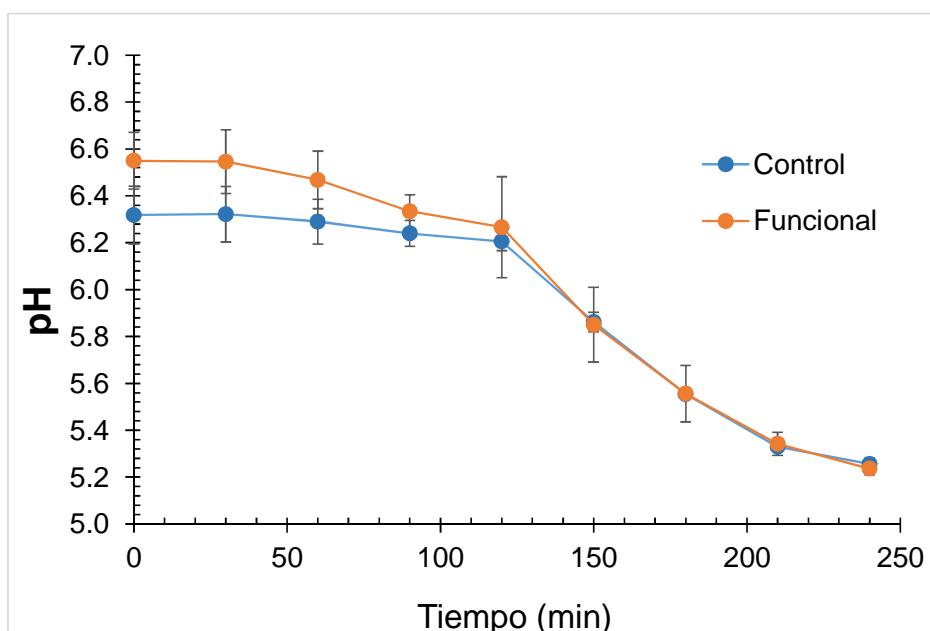


Figura 52. Curvas de descenso del pH (37,7 °C) obtenidas a escala industrial en la cuajada control (sin fitoesteroles) y en la funcional (con fitoesteroles esterificados, FEE, agregados). Se indica la media y las barras corresponden al desvío estándar ($n = 5$). Cada punto es el promedio de mediciones de pH realizadas en sitios distintos de la horma de todas las elaboraciones.

En la primera parte, las curvas inician separadamente pero alrededor de los 120 minutos los valores de ambas fermentaciones se emparejan y descienden más rápidamente, con mayor pendiente, alcanzando los mismos valores en los mismos lapsos (**Fig. 52**). De todos modos, esos valores iniciales no poseen diferencias significativas ($p>0,05$), presentando ambos productos finales las mismas características. El descenso del pH en todas las elaboraciones a escala industrial mostró entonces dos etapas. La primera ocurre entre los 0 y 120 minutos, con una cinética

que, si se la fuerza a un ajuste lineal, muestra que la velocidad de descenso del pH es de 0,056 unidades de pH/h para los quesos control y de 0,14 unidades/h para los funcionales, conteniendo FEE. Por otro lado, en la segunda etapa, la cual se dio a partir de los 120 minutos (**Fig. 52**), forzando un ajuste lineal, se determinó una pendiente promedio de 0,50 unidades/h para ambos quesos, control y funcional, la cual es algo mayor a la obtenida a partir del descenso del pH en la elaboración a escala piloto (**Fig. 51**), con el queso control y el queso funcional. Esto podría indicar un acondicionamiento de los quesos en las primeras dos horas de oreo, hasta llegar a las condiciones óptimas de acción de los fermentos para producir el descenso de pH hasta lograr el valor final deseado (**Fig. 52**). En los 120 min iniciales puede estar ocurriendo la hidratación de los fermentos ya que los mismos son agregados en forma de polvo liofilizado. En la primera etapa, el descenso del pH va incrementando en velocidad punto a punto hasta los 120 min. Posterior a este instante, punto a punto, la velocidad de descenso del pH va disminuyendo hasta los 240 min registrados. Tal como fuera arriba reportado, la disminución del pH prueba que el fermento permaneció activo pero se podría decir que su actividad se manifiesta con una cinética diferente que la observada a las escalas laboratorio (**Fig. 40A**) y planta piloto (**Fig. 51**).

5.7.4. Composición y propiedades de los quesos

En la **Tabla 49** se muestran los resultados de la composición y propiedades químicas de los quesos obtenidos a escala industrial. A diferencia de la elaboración a escala piloto, en donde los análisis de composición y microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Calidad de Leche de la EEA-Rafaela (Santa Fe), las determinaciones para la escala industrial fueron efectuadas en el FUNESIL (Fundación Cultural de Profesores y Amigos de la Escuela Superior Integral de Lechería, Villa María, provincia de Córdoba). Este es un centro de referencia en lechería que utiliza la metodología oficial y se encuentra certificado para realizar estos tipos de análisis en matrices lácteas.

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en los parámetros medidos, salvo en el contenido de grasa (**Tabla 49**). Este resultado ya se había observado en la elaboración efectuada a escala piloto (**Tabla 40**). El incremento en la grasa es esperable, ya que los fitoesteroles esterificados (FEE) aportan un porcentaje significativo ($p<0,05$) al producto final (3,4% en peso) (**Tabla 29B**). Sin embargo, a pesar del incremento, el producto cuenta con el requisito para ser clasificado como *light* o “reducido en grasa”.

El rendimiento quesero obtenido es de alrededor del 10,7% o kg de queso por cada 100 kg de leche utilizada (**Tabla 49**). A modo de ejemplo, Baccifava et al. (2016) produjeron a nivel industrial queso fresco con un rendimiento de 14,21 kg de queso/100 kg de leche.

Tabla 49. Composición¹ y propiedades químicas¹ de los quesos obtenidos a escala industrial sin fitoesteroles o control (C) y con fitoesteroles esterificados agregados (funcional).

	Control	Funcional	<i>p</i>
Humedad %	52,42 ± 1,1	51,56 ± 1,4	NS
Grasa %	16,68 ± 1,1	19,32 ± 1,1	*
Proteína %	24,46 ± 1,3	25,17 ± 1,5	NS
Rendimiento %	10,69	10,8	NS

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar (*n* = 3).

NS: no significativa (*p*<0,05)

(*) Significativamente diferente (*p*<0,05).

En la **Tabla 50**, en tanto, se muestran los resultados del análisis microbiológico de los quesos obtenidos en las elaboraciones realizadas a escala industrial. Los resultados mostraron la aptitud microbiológica de los quesos, ajustándose a la normativa especificada en el Código Alimentario Argentino (Capítulo VIII, Artículo 605) para este tipo de productos.

Tabla 50. Composición microbiológica de los quesos Por Salut *light* obtenidos a escala industrial sin fitoesteroles (control) y con fitoesteroles esterificados agregados (funcional)

Descripción	Queso control	Queso funcional	<i>p</i>
Coliformes 30°C (UFC/g)	<1000	<1000	NS
Coliformes 45°C (UFC/g)	<30	<30	NS
Bacterias aerobias sulfito reductoras (UFC/g)	<10	<10	NS
Estafilococo coagulasa positivo (UFC/g)	<100	<100	NS
<i>Escherichia coli</i> presuntiva (presencia/g)	nd	nd	---
Hongos y levaduras (UFC/g)	<100	<100	NS
<i>Listeria spp.</i> (presencia/25 g)	nd	nd	----
<i>Salmonella spp.</i> (presencia/25 g)	nd	nd	----
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<100	<100	NS

5.7.5. Humedad y compuestos bioactivos en los quesos

El ensayo en condiciones de almacenamiento fue realizado a lo largo de 90 días a 4°C y 80% de humedad relativa (sección 4.10.1), envasados en film impermeable al vapor de agua.

La **Figura 53** muestra la evolución del contenido de humedad en los quesos control y funcional. Los valores de humedad determinados en este período variaron entre el 49,86 y 53,80 g

de agua por cada 100 g de producto fresco, los cuales corresponden a un tipo de queso de alta humedad (Secretaría de Agroindustria, 2015). La fluctuación entre estos dos valores se observó a lo largo de los diferentes tiempos de almacenamiento. Sin embargo esta variación no representó un problema tecnológico en los quesos obtenidos a escala industrial.

La **Figura 53** muestra que la humedad inicial del queso control y del funcional fue de alrededor de 52,25%, manteniéndose relativamente constante hasta los 60 y 76 días de almacenamiento, mostrando valores significativamente ($p<0,05$) mayores en estos tiempos.

Las superposiciones de datos y sus diferencias podrían explicarse por la dispersión (coeficientes de variación) de los valores en ambos tipos de queso, entre sí, siendo esta dispersión un poco menor para los 60 días (barras de error; **Fig. 53**). Por ejemplo, a los 90 días, la diferencia en los valores extremos de los quesos funcionales llega a variar entre 49,7% y 51,3 % de humedad mínima y máxima respectivamente, las cuales se ubican por encima y debajo del promedio del tiempo 0 (7días) (**Fig. 53**).

De este modo, la **Figura 53** observada en su totalidad nos permite concluir que las diferencias detectadas son esperables en condiciones industriales de elaboración, ya que en todos los casos los quesos se encontraron dentro de los rangos establecidos para este tipo de producto. Cabe señalar que los resultados obtenidos a los 90 días corresponden a un tiempo que se considera extremo y fuera de la vida útil comercial del queso. Este muestreo se realizó para conocer el comportamiento de los parámetros en condiciones extremas o de vida útil extendida.

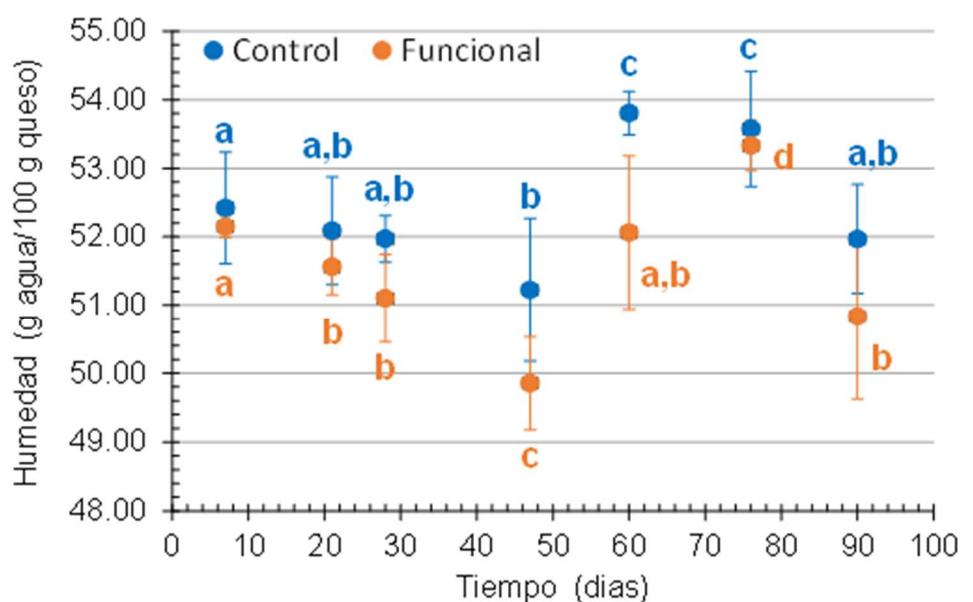


Figura 53. Humedad de los quesos Por Salut control y funcional (con fitoesteroles) producidos a escala industrial, determinada durante el almacenamiento a 4°C y 80% de humedad relativa. Se indica la media y las barras de desvío estándar ($n = 5$). Letras iguales para un mismo tipo de queso implica que no hay diferencias significativas ($p<0,05$).

En las **Tablas 51 y 52** se presentan los resultados de los análisis correspondientes a los compuestos bioactivos γ y α tocoferoles, respectivamente, en los quesos elaborados a escala industrial. A diferencia de las elaboraciones realizadas hasta aquí, estos compuestos fueron analizados y cuantificados a lo largo de toda la vida útil extendida estudiada (0 a 90 días) bajo condiciones de almacenamiento a 4°C y 80% de humedad relativa de los quesos envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tabla 51. Contenido¹ de γ -tocoferol en los quesos Por Salut *light* (mg/60 g de queso) obtenidos a escala industrial sin fitoesteroles o control y con fitoesteroles esterificados agregados (funcional). Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C; 80% de humedad relativa) envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo vida útil (días)	Control	Funcional
7	0,01 ^a \pm 0,005	5,29 ^{cd} \pm 0,536
21	0,02 ^a \pm 0,005	4,73 ^{bc} \pm 0,189
28	0,02 ^a \pm 0,002	4,61 ^{bc} \pm 0,080
47	0,02 ^a \pm 0,002	5,33 ^{cd} \pm 0,301
60	0,02 ^a \pm 0,006	4,98 ^b \pm 0,060
76	0,02 ^a \pm 0,006	4,98 ^b \pm 0,335
90	0,03 ^a \pm 0,005	5,40 ^{cd} \pm 0,261

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$).

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observó una diferencia significativa en los contenidos de γ -tocoferol entre el queso funcional y el control (**Tabla 51**). Esta diferencia se dio debido a que, como se mencionó anteriormente, los FEE ya contienen tocoferol como aditivo antioxidante para su conservación. Por ello, este tocoferol se incorpora simultáneamente al queso y serviría para conferir estabilidad oxidativa al producto que contiene un exceso de ácidos grasos insaturados (**Tabla 29A**) en relación a los quesos Por Salut *light* convencionales.

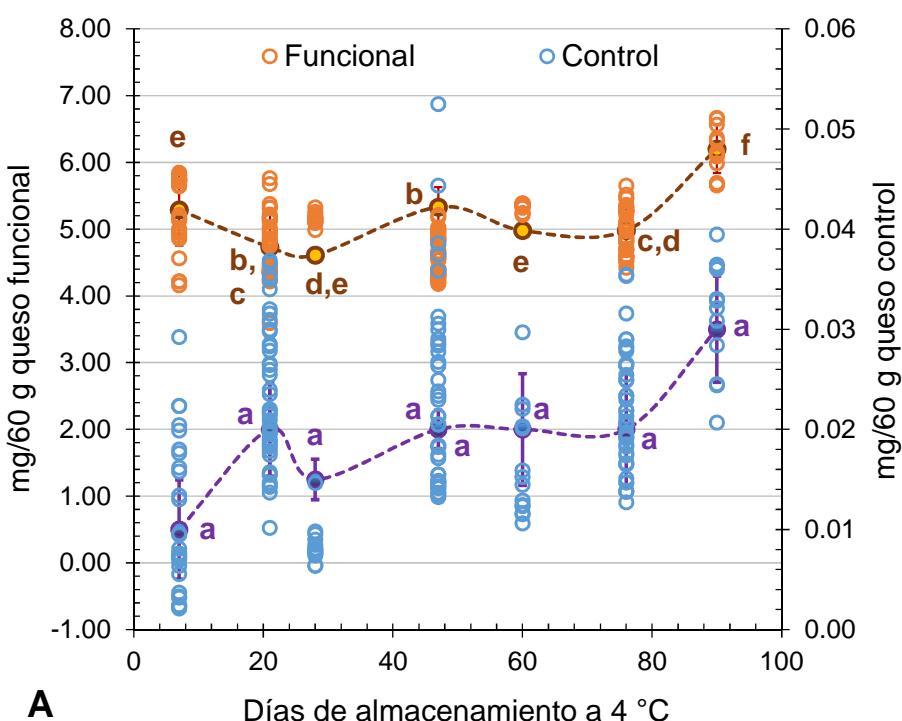
Tabla 52. Contenido de α -tocoferol en los quesos Por Salut *light* (mg/60 g de queso) obtenidos a escala industrial sin fitoesteroles o control y con fitoesteroles esterificados agregados (funcional). Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C; 80% de humedad relativa) envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo vida útil (días)	Control	Funcional
7	0,12 ^a \pm 0,02	3,98 ^b \pm 0,03
21	0,14 ^a \pm 0,01	3,74 ^b \pm 0,07
28	0,08 ^a \pm 0,01	3,19 ^b \pm 0,02
47	0,14 ^a \pm 0,04	4,08 ^b \pm 0,55
60	0,08 ^a \pm 0,00	4,23 ^c \pm 0,02
76	0,12 ^a \pm 0,04	3,91 ^c \pm 0,29
90	0,16 ^a \pm 0,02	4,55 ^c \pm 0,29

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$).

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los promedios que se observan en las **Tablas 51** y **52** son el resultado de cinco elaboraciones de quesos controles y funcionales a lo largo de tres años diferentes. Nuevamente, como en el caso de la humedad, los resultados obtenidos en las diferentes elaboraciones industriales mostraron una alta dispersión, tal como se muestra en la **Figura 54**.



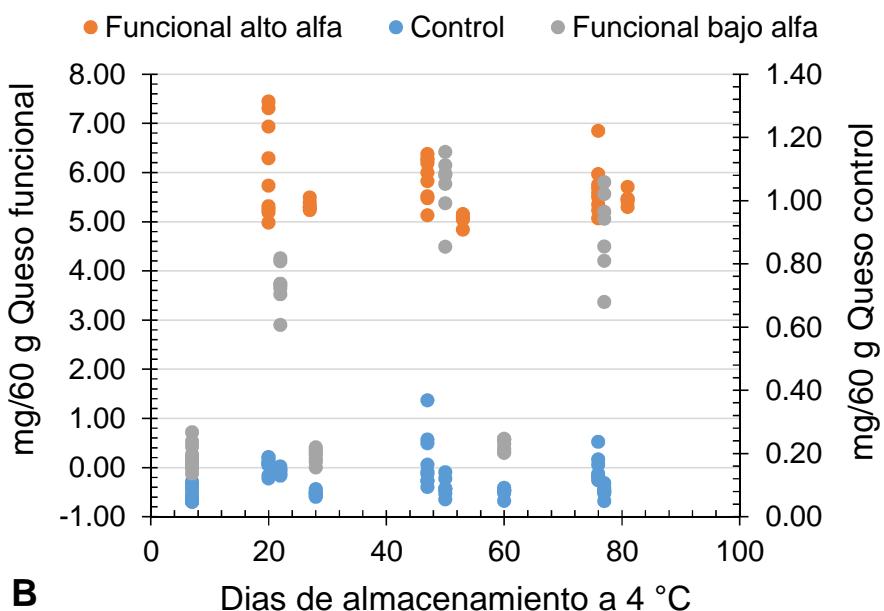


Figura 54. Fluctuación de los valores de (A) γ -tocoferol y de (B) α -tocoferol determinados durante el almacenamiento en quesos Por Salut *light* producidos a escala industrial control (sin fitoesteroles; eje derecho) y funcional (con fitoesteroles agregados; eje izquierdo). Para A: se indica la media y el desvío estándar ($n = 5$); letras iguales en un dado tratamiento implica diferencias no significativas ($p < 0.05$). Para B: alto en α -tocoferol (α -tocoferol agregado) y bajo en α -tocoferol (nivel de α -tocoferol aportado por la leche).

La presencia natural de tocoferoles en las leches tiene su origen en la alimentación de las vacas lecheras. De este modo, una alimentación pastoril (particularmente en los meses de primavera-verano) favorece la incorporación de α -tocoferol, mientras que el γ -tocoferol está asociado a las dietas con contenido de concentrados de granos y oleaginosas (Descalzo et al., 2012; Rossetti, 2015). Este resultado se reflejó al observar la diferencia entre los valores de ambos isómeros en los quesos control de las **Tablas 51 y 52**.

El contenido de α -tocoferol en los quesos control mostró un promedio de 0,14 mg/60 g queso, el cual se tomó como el valor basal. La presencia de esta vitamina en quesos y en lácteos en general se debe a su incorporación en tejidos animales a través de la proteína de transporte del tocoferol (TTP), en forma preferencial a los otros isómeros del tocoferol (Kono & Arai, 2015). Esta proteína se encuentra presente en los tejidos de los mamíferos y con mayor expresión en el hígado, e incorpora preferentemente las formas RRR y RRS α -tocoferol entre todos los posibles isómeros (Hayes et al. 2001; Stocker, 2004; Baró Rodríguez et al., 2010). Estas son también las dos formas biológicas más importantes de la vitamina E en humanos (Kono & Arai 2015) y, por lo tanto, el queso funcional sirve como fuente de este compuesto. Durante la vida útil no se afectó la estabilidad del isómero alfa (**Tabla 52**), al igual que en el caso del isómero gama (**Tabla 51**).

Como era de esperar, el α -tocoferol mostró diferencias entre los quesos control y funcional, sobre todo en las elaboraciones que tuvieron la adición ex profeso de este compuesto (funcional "alto alfa"; **Fig. 54B**). El promedio en los controles fue de 0,14 mg/60 g de queso, el cual se tomó

como el valor basal, mientras que los adicionados con α -tocoferol (quesos "alto alfa"), tuvieron valores promedio de 4 mg/60 g de queso, correspondiendo aproximadamente al 30% de la dosis diaria recomendada de ingesta de vitamina E. Dicha adición se realizó para evitar el deterioro oxidativo de los quesos funcionales (con FE agregados) durante su almacenamiento refrigerado, cumpliendo en simultáneo con el propósito biológico de actuar como fuente de vitamina E, ya que ensayos recientes demostraron que esta vitamina se incorpora en forma más eficiente cuando se asocia a una matriz lipídica, en este caso el queso (Traber et al., 2019).

Como los tocoferoles son liposolubles, se concentran en el queso. Su deterioro químico va a depender de las características de la elaboración y conservación que pueden modular la oxidación en la matriz del alimento. Se evidenció una alta dispersión de los valores de tocoferoles entre los diferentes ensayos, lo cual explicaría coeficientes de variación entre las medias que van desde 15% al 67% (**Fig. 54**). Todos los valores de estos compuestos bioactivos fueron expresados por cada 60 g de queso, ya que esta es la porción que tiene carácter funcional en cuanto a que provee la dosis de fitoesteroles requerida según la EFSA (2010).

Si bien se observó una fluctuación de la humedad durante el almacenamiento, no se expresaron los resultados en base seca porque de este modo: i) no representaría la cantidad de compuestos bioactivos recomendada; ii) los fenómenos de oxidación se expresan y explican en la matriz húmeda, ya que dependen de la presencia de agua en la misma; iii) los coeficientes de variación de los parámetros medidos son altos por las razones explicadas anteriormente y expresarlos en base seca no aportaría a la discusión, ya que la prueba de ANOVA realizada para los resultados del contenido de γ -tocoferol en los quesos controles mostró la misma tendencia, esto es, valores de $F > F$ crítico, de 24,4 y 2,15 para los datos expresados en base seca y de 24,9 y 2,15 para los mismos expresados en base húmeda o del producto total.

Es por ello que, a la luz de los resultados globales observados, se puede concluir que no hubo una degradación de los tocoferoles durante el almacenamiento refrigerado de los quesos, y que las fluctuaciones tienen origen en: i) la materia prima y su estacionalidad, ii) la variabilidad de los lotes de FEE, iii) la escala de elaboración industrial (tinajas de 2500 litros) y iv) las condiciones de producción en planta (rotación de personal, diferentes períodos de optimización y de elaboración del producto).

En la **Tabla 53** se presentan los resultados de los análisis correspondientes al retinol en los quesos elaborados a escala industrial. No se observaron diferencias significativas en lo que respecta al contenido de retinol dentro de los tratamientos ni entre tratamientos funcionales, no observándose además ninguna disminución en la concentración del mismo durante el almacenamiento de los quesos.

Tabla 53. Contenido de retinol en los quesos Por Salut *light* (mg/60 g de queso) obtenidos a escala industrial sin fitoesteroles o control y con fitoesteroles esterificados agregados (funcional). Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C; 80% de humedad relativa) envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo vida útil (días)	Control		Funcional	
7	0,03 ^{ab}	± 0,006	0,02 ^{ab}	± 0,008
21	0,05 ^f	± 0,008	0,02 ^a	± 0,005
28	0,04 ^d	± 0,006	0,05 ^{ef}	± 0,004
47	0,05 ^d	± 0,007	0,04 ^d	± 0,006
60	0,03 ^{cd}	± 0,007	0,02 ^a	± 0,004
76	0,04 ^{de}	± 0,008	0,03 ^{bcd}	± 0,008
90	0,05 ^f	± 0,007	0,04 ^d	± 0,004

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El retinol es la forma activa de la vitamina A. Pertenece a un grupo de compuestos liposolubles (ésteres de retinilo). Entre los alimentos de origen animal, los productos lácteos y el hígado son fuentes ricas en esta vitamina. Los animales convierten parcialmente el β -caroteno, el cual originalmente proviene de los vegetales, en retinol durante o después de la absorción (Ullah et al., 2017). La vitamina A no se adiciona en la industria para este tipo de quesos, por lo tanto, su concentración en ellos es el resultado de la vitamina A natural, metabolizada por las vacas lecheras. Su concentración en los quesos es muy baja como para ellos ser considerados una fuente significativa de esta vitamina (Ullah et al., 2017).

En la **Tabla 54** se presentan los resultados de los análisis correspondientes al β -caroteno en los quesos elaborados a escala industrial. Como arriba se mencionó, el β -caroteno es de origen vegetal. Aparece en la leche naturalmente a través de la dieta del ganado vacuno. También se lo conoce como provitamina A porque el organismo humano lo convierte fácilmente en retinol (vitamina A) (Ullah et al., 2017). Las dietas pastoriles en general confieren mayor concentración de β -caroteno que las dietas a base de grano y, por lo tanto, su presencia en la leche es estacional (Marino et al., 2012; Rossetti, 2015). Para el contenido de β -caroteno, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (**Tabla 54**). Los quesos funcionales mostraron un orden menor de concentración de β -caroteno que los quesos controles. Este resultado no puede explicarse por un efecto del metabolismo de los animales, ya que la leche utilizada es la misma para todos los tipos de quesos. Este fenómeno de “expulsión” del β -caroteno podría deberse a una competencia con los FEE por mantenerse en la matriz, dentro de los glóbulos de grasa. Esto fue descripto para la β -criptoxantina, otro carotenoide provitamínico (Hernández-Alvarez, 2016). Sin embargo, la literatura que relaciona la incorporación conjunta de carotenoides y fitoesteroles a las fases micelares mixtas es escasa y requiere de un estudio con mayor profundidad.

Tabla 54. Contenido de β -caroteno en los quesos Por Salut *light* ($\mu\text{g}/60\text{ g}$ de queso) obtenidos a escala industrial sin fitoesteroles o control y con fitoesteroles esterificados agregados (funcional). Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C ; 80% de humedad relativa) envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo vida útil (días)	Control		Funcional	
	11,92 ^b	\pm 0,32	4,17 ^a	\pm 0,04
7	11,92 ^b	\pm 0,32	4,17 ^a	\pm 0,04
21	18,40 ^{de}	\pm 0,28	3,54 ^a	\pm 0,06
28	13,53 ^b	\pm 0,22	2,69 ^a	\pm 0,05
47	19,74 ^e	\pm 0,57	3,46 ^a	\pm 0,05
60	12,85 ^b	\pm 0,15	3,29 ^a	\pm 0,04
76	16,08 ^{cd}	\pm 0,36	3,50 ^a	\pm 0,05
90	18,58 ^{de}	\pm 0,29	3,23 ^a	\pm 0,04

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la concentración de fitoesteroles (**Tabla 55**), ésta no se vio afectada por el tiempo de vida útil ($p > 0,05$). Como se observa para el queso funcional, la concentración total de fitoesteroles es de 2,18-2,51 g/60 g de queso. De este modo, a escala industrial se alcanzó la dosis objetivo de 2,2 g de FEL/60 g de queso (**Fig. 41**), en acuerdo por lo exigido por la EFSA (2010), manteniendo esa concentración óptima durante toda la vida útil de los quesos. Este es un logro sustancial ya que cumple con el objetivo que motivó el presente desarrollo.

Tabla 55. Contenido¹ de fitoesteroles libres (FEL) en los quesos Por Salut *light* funcional (mg/60 g de queso) obtenidos a escala industrial con fitoesteroles esterificados agregados. Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C; 80% de humedad relativa), envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo	Control	Funcional (g de FEL/60 g de queso)									
		Campesterol		Estigmasterol		Beta sitoesterol		FEL total ²			
7	ND	0,63	± 0,02	0,88	± 0,01	0,92	± 0,03	2,44	± 0,03		
21	ND	0,44	± 0,01	0,76	± 0,01	1,08	± 0,01	2,28	± 0,03		
28	ND	0,50	± 0,01	0,70	± 0,03	1,31	± 0,01	2,51	± 0,03		
47	ND	0,58	± 0,02	0,68	± 0,01	1,11	± 0,02	2,38	± 0,03		
60	ND	0,51	± 0,03	0,68	± 0,05	0,99	± 0,02	2,18	± 0,05		
76	ND	0,49	± 0,01	0,79	± 0,01	1,05	± 0,01	2,33	± 0,03		
90	ND	0,49	± 0,03	0,90	± 0,02	1,07	± 0,03	2,46	± 0,05		

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$).

²Expresado como la suma de campesterol, estigmasterol y beta sitoesterol.

ND: no detectable.

5.7.6. Perfil de ácidos grasos

El queso se encuentra apto para su consumo a partir del día 21 después de su elaboración, ya que hasta este día se encuentra el queso almacenado en cámara a 4°C para su maduración.

El perfil de ácidos grasos se determinó en los quesos control y funcional durante los tiempos de vida útil estudiados (26, 40, 60 y 80 días) (**Tabla 56**). Se esperaba una diferencia significativa en lo que respecta a la concentración y composición química en ácidos grasos entre ambos tipos de queso, atribuibles a los ácidos grasos que esterifican los FEE adicionados a los quesos funcionales. Efectivamente, se observaron en general diferencias significativas ($p<0,05$) para la mayoría de los ácidos grasos entre los quesos control y funcional (**Tabla 56**). Cabe destacar que estas diferencias se encuentran dentro de los valores normales que informaron varios autores en quesos similares (Prandini et al., 2012; Gagliostro et al., 2020).

El principal ácido graso presente en la leche y productos lácteos derivados es el ácido palmítico (C16:0). En el presente trabajo la concentración resultó mayor ($p<0,0001$) en los quesos control respecto a los funcionales (27,44 vs 25,26 %), el mismo comportamiento se observó para los ácidos mirístico (C14:0) y esteárico (C18:0), los cuales presentaron mayores concentraciones ($p<0,0001$) en los quesos control (9,96 vs 9,36 y 13,5 vs 10,13 %) respectivamente. De manera similar, el ácido láurico (C12:0) presentó mayor concentración ($p<0,05$) en los quesos control respecto a los funcionales (2,90 vs 2,76 %). La ingesta de ácidos grasos saturados C12:0, C14:0 y C16:0, presentes en cantidades importantes en la grasa láctea, siempre fue considerada poco

saludable por ser hipercolesterolémicos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los componentes de la matriz láctea modificarían la respuesta de los lípidos en sangre a la ingesta de ácidos grasos saturados. Como consecuencia, estos ácidos grasos podrían no tener impacto sobre los parámetros de salud cardiovascular (Gómez-Cortés, et al., 2018).

Por otro lado, los ácidos grasos esenciales linoleico (C18:2 AL) y linolénico (C18:3 ALA) precursores de las series n-6 y n-3, respectivamente, son los que mostraron diferencias destacables entre los quesos control y funcional. El contenido de AL fue significativamente ($p<0,0001$) mayor (≈ 2 veces) en los quesos funcionales respecto a los controles (5,69 vs 2,95 %), mientras que el contenido de ALA tuvo un comportamiento similar ($\approx 2,5$ veces mayor), con valores de 1,09 vs 0,44 % para funcional y control, respectivamente ($p<0,0001$). Como consecuencia de estos incrementos, y a pesar de que ambos ácidos grasos aumentaron en los quesos funcionales, proporcionalmente el aumento de ALA fue mayor lo cual se reflejó en una relación AL/ALA menor ($p<0,05$) en los quesos funcionales. Finalmente, considerando el tenor de grasa total de los quesos control y funcional (**Tabla 32**), el aporte de ALA por porción (60 gramos de queso) es de 40 mg para el queso control y de 130 mg para el queso funcional. Este hecho resulta de particular interés dado que los quesos funcionales, desde el punto de vista de la nutrición humana, estarían aportando cantidades significativas de este ácido graso esencial, que es precursor de la serie n-3 (Kuhnt et al., 2012; Fan et al., 2020).

El ácido oleico (*cis*-9 C18:1) es el segundo ácido graso más abundante en la leche y productos lácteos derivados. En el presente trabajo, su concentración fue mayor ($p<0,0001$) en los quesos funcionales respecto a los controles (28,7 vs 25,2 %). Este ácido graso es de importancia nutricional, reconocido como agente antiaterogénico que promueve efectos positivos sobre la salud humana (López-Huertas, 2010). De esta manera, los quesos funcionales no sólo tienen un impacto positivo sobre la salud en personas hipercolesterolémicas, sino que podrían tener un beneficio “adicional” por su composición en ácidos grasos beneficiosos.

El efecto del tiempo de maduración sólo fue evidente para la proporción de ácido eicosapentaenoico (EPA: 20:5, n-3), el cual sufrió una disminución (**Tabla 56**), pudiendo evidenciar de este modo el efecto de la destrucción de los ácidos grasos más lábiles y la aparición de productos de oxidación primarios como hidroperóxidos lipídicos, los cuales podrían descomponerse luego a productos de oxidación secundarios como aldehídos (Halvorsen & Blomhoff, 2011). Martino et al. (2019) y Kilcawley et al. (2018) también observaron y reportaron el incremento de la oxidación después de la maduración debido al incremento del contenido de AG no saturados, a pesar de los antioxidantes naturales presentes (tocoferoles, vitaminas, lactoferrina, enzimas, carotenoides y urato) propios de la leche.

Como consecuencia de las diferencias expresadas, también los índices correspondientes se vieron afectados por el tratamiento. Los quesos control presentaron mayor sumatoria de ácidos grasos saturados (AGS) y de monoinsaturados (AGMI), mientras que los funcionales fueron mayores en contenido de AGPI ($p<0,05$), manteniéndose constante la relación n-6/n-3 para cada queso (**Tabla 56**).

Tabla 56. Perfil de ácidos grasos (% FAME) en quesos control y funcional obtenidos a escala industrial durante el tiempo de vida útil (26, 40, 60 y 80 días) realizado a 4°C.

Ácidos grasos (% FAME)	Control				Funcional				Efecto		
	26	40	60	80	26	40	60	80	Tratam.	tiempo	Intera.
10:0	2,03 (0,27)	2,23 (0,32)	2,24 (0,12)	2,29 (0,17)	2,35 (0,08)	2,07 (0,03)	2,01 (0,23)	2,20 (0,17)	0,669	0,847	0,178
10:1 + 11:0	0,25 (0,03)	0,26 (0,04)	0,26 (0,01)	0,26 (0,02)	0,29 (0,01)	0,26 (0,01)	0,26 (0,02)	0,28 (0,02)	0,248	0,763	0,389
12:0	2,79 (0,13) ^b	2,92 (0,15) ^b	2,94 (0,02) ^b	2,94 (0,02) ^b	3,01 (0,17) ^a	2,66 (0,10) ^a	2,71 (0,01) ^a	2,64 (0,03) ^a	0,026	0,400	0,012
c9 12:1	0,07 (0,00)	0,06 (0,00)	0,06 (0,00)	0,07 (0,00)	0,07 (0,00)	0,06 (0,00)	0,06 (0,01)	0,06 (0,00)	0,293	0,215	0,872
c11 12:1	0,10 (0,05)	0,13 (0,04)	0,11 (0,07)	0,16 (0,00)	0,14 (0,05)	0,09 (0,00)	0,12 (0,05)	0,15 (0,00)	0,981	0,445	0,643
i 14:0	0,11 (0,01) ^b	0,09 (0,00) ^{ab}	0,10 (0,00) ^a	0,09 (0,00) ^a	0,11 (0,00) ^b	0,10 (0,00) ^{ab}	0,10 (0,00) ^a	0,09 (0,00) ^a	0,827	0,006	0,631
14:0	10,04 (0,13) ^b	9,88 (0,00) ^b	9,97 (0,10) ^b	9,93 (0,16) ^b	9,91 (0,52) ^a	9,00 (0,26) ^a	9,30 (0,02) ^a	8,96 (0,23) ^a	0,000	0,034	0,118
i 15:0	0,22 (0,02) ^b	0,20 (0,00) ^b	0,20 (0,00) ^b	0,20 (0,00) ^b	0,18 (0,02) ^a	0,16 (0,00) ^a	0,17 (0,00) ^a	0,17 (0,01) ^a	0,000	0,100	0,985
ai 15:0	0,45 (0,04) ^b	0,43 (0,01) ^b	0,43 (0,02) ^b	0,42 (0,01) ^b	0,41 (0,01) ^a	0,39 (0,01) ^a	0,39 (0,01) ^a	0,38 (0,01) ^a	0,006	0,205	0,996
c9 14:1	0,96 (0,07) ^b	0,85 (0,03) ^{ab}	0,86 (0,04) ^{ab}	0,84 (0,02) ^{ab}	0,86 (0,02) ^{ab}	0,84 (0,04) ^{ab}	0,85 (0,04) ^{ab}	0,80 (0,01) ^a	0,111	0,042	0,384
15:0	0,97 (0,03) ^b	0,90 (0,00) ^b	0,90 (0,01) ^b	0,92 (0,02) ^b	0,88 (0,04) ^a	0,82 (0,00) ^a	0,84 (0,01) ^a	0,82 (0,01) ^a	0,000	0,006	0,639
i 16:0	0,27 (0,03) ^b	0,24 (0,01) ^b	0,23 (0,02) ^b	0,22 (0,01) ^b	0,22 (0,01) ^a	0,21 (0,00) ^a	0,20 (0,03) ^a	0,19 (0,00) ^a	0,002	0,028	0,601
16:0	28,05 (0,81) ^b	27,13 (0,26) ^b	27,19 (0,31) ^b	27,10 (0,46) ^b	26,80 (1,74) ^a	24,52 (0,16) ^a	24,77 (0,16) ^a	24,17 (0,38) ^a	0,000	0,031	0,476
t9 16:1	0,41 (0,06) ^b	0,34 (0,01) ^b	0,34 (0,00) ^b	0,37 (0,03) ^b	0,27 (0,02) ^a	0,26 (0,01) ^a	0,26 (0,03) ^a	0,29 (0,00) ^a	0,000	0,188	0,449
c7 16:1	0,26 (0,01) ^b	0,21 (0,04) ^b	0,20 (0,05) ^b	0,20 (0,00) ^b	0,18 (0,03) ^a	0,21 (0,00) ^a	0,16 (0,00) ^a	0,17 (0,00) ^a	0,013	0,109	0,216
c9 16:1	1,54 (0,25) ^b	1,50 (0,26) ^b	1,50 (0,25) ^b	1,62 (0,07) ^b	1,31 (0,10) ^a	1,21 (0,03) ^a	1,35 (0,16) ^a	1,50 (0,03) ^a	0,038	0,459	0,893
17:0	0,58 (0,01) ^b	0,57 (0,01) ^b	0,56 (0,00) ^b	0,60 (0,03) ^b	0,48 (0,10) ^a	0,47 (0,02) ^a	0,48 (0,04) ^a	0,48 (0,00) ^a	0,000	0,520	0,719
c10 17:1	0,23 (0,01)	0,21 (0,0,1)	0,18 (0,05)	0,21 (0,01)	0,20 (0,02)	0,20 (0,00)	0,19 (0,15)	0,19 (0,00)	0,197	0,299	0,565
18:0	12,80 (1,13) ^b	13,97 (0,11) ^b	13,87 (0,10) ^b	13,86 (0,27) ^b	9,69 (0,60) ^a	10,50 (0,33) ^a	10,31 (0,15) ^a	10,25 (0,07) ^a	0,000	0,080	0,896
t 6/7/8 18:1	0,41 (0,03) ^b	0,36 (0,07) ^b	0,37 (0,05) ^b	0,32 (0,00) ^b	0,27 (0,09) ^a	0,34 (0,01) ^a	0,31 (0,06) ^a	0,28 (0,01) ^a	0,017	0,558	0,418
t9 18:1	0,28 (0,04)	0,29 (0,02)	0,27 (0,01)	0,29 (0,01)	0,22 (0,05)	0,32 (0,04)	0,30 (0,02)	0,29 (0,03)	0,277	0,920	0,326
t10 18:1	0,92 (0,09) ^b	0,93 (0,05) ^b	0,91 (0,11) ^b	0,78 (0,06) ^b	0,45 (0,20) ^a	0,62 (0,00) ^a	0,74 (0,25) ^a	0,57 (0,14) ^a	0,000	0,031	0,383
t11 18:1	1,83 (0,34) ^b	1,55 (0,15) ^b	1,53 (0,13) ^b	1,56 (0,13) ^b	1,08 (0,24) ^a	1,34 (0,05) ^a	1,39 (0,02) ^a	1,38 (0,11) ^a	0,008	0,998	0,111

Tabla 56 (continuación). Perfil de ácidos grasos (% FAME) en quesos control y funcional durante el tiempo de maduración (26, 40, 60 y 80 días) a 4°C.

c9 18:1	24,91 (0,55) ^a	25,48 (0,57) ^a	25,37 (0,14) ^a	25,02 (0,28) ^a	27,68 (1,76) ^b	29,20 (0,62) ^b	29,24 (0,59) ^b	29,22 (0,23) ^b	0,000	0,255	0,621
c11 18:1	0,78 (0,31) ^a	0,44 (0,20) ^a	0,65 (0,02) ^a	1,00 (0,10) ^a	0,93 (0,02) ^b	0,97 (0,05) ^b	0,96 (0,02) ^b	1,62 (0,09) ^b	0,000	0,001	0,161
c12 18:1	0,31 (0,03) ^a	0,29 (0,01) ^a	0,31 (0,05) ^a	0,22 (0,10) ^a	0,36 (0,05) ^b	0,34 (0,01) ^b	0,31 (0,06) ^b	0,40 (0,00) ^b	0,011	0,763	0,099
18:2 n-6 (AL)	2,74 (0,35) ^a	3,08 (0,01) ^a	3,06 (0,07) ^a	3,03 (0,15) ^a	5,54 (0,12) ^b	5,75 (0,11) ^b	5,68 (0,24) ^b	5,85 (0,04) ^b	0,000	0,109	0,855
20:0	0,18 (0,03) ^a	0,18 (0,03) ^a	0,17 (0,03) ^a	0,16 (0,02) ^a	0,25 (0,08) ^b	0,35 (0,01) ^b	0,25 (0,14) ^b	0,13 (0,00) ^b	0,039	0,135	0,227
18:3 n-3 (ALA)	0,48 (0,07) ^a	0,42 (0,03) ^a	0,42 (0,03) ^a	0,44 (0,00) ^a	1,28 (0,35) ^b	0,91 (0,03) ^b	0,98 (0,09) ^b	1,09 (0,01) ^b	0,000	0,223	0,477
c9,t11 (CLA)	1,00 (0,06) ^b	0,72 (0,02) ^a	0,71 (0,03) ^a	0,67 (0,00) ^a	0,63 (0,07) ^a	0,68 (0,01) ^a	0,65 (0,07) ^a	0,65 (0,01) ^a	0,000	0,002	0,000
20:4 n-6	0,13 (0,03) ^b	0,16 (0,00) ^b	0,16 (0,01) ^b	0,16 (0,01) ^b	0,13 (0,01) ^a	0,14 (0,00) ^a	0,14 (0,00) ^a	0,13 (0,01) ^a	0,028	0,111	0,561
20:5 n-3	0,02 (0,00) ^b	0,02 (0,00) ^{ab}	0,02 (0,00) ^a	0,02 (0,00) ^{ab}	0,03 (0,00) ^b	0,03 (0,00) ^{ab}	0,02 (0,00) ^a	0,02 (0,00) ^{ab}	0,129	0,017	0,052
24:0	0,03 (0,00) ^c	0,02 (0,00) ^{ab}	0,03 (0,00) ^c	0,03 (0,00) ^{bc}	0,06 (0,00) ^e	0,05 (0,00) ^d	0,05 (0,00) ^d	0,02 (0,00) ^a	0,000	0,000	0,000
22:4 n-6	0,03 (0,00)	0,03 (0,00)	0,03 (0,00)	0,05 (0,00)	0,02 (0,00)	0,03 (0,00)	0,02 (0,00)	0,03 (0,00)	0,706	0,667	0,242
22:5 n-3	0,06 (0,00) ^b	0,06 (0,00) ^{ab}	0,05 (0,00) ^{ab}	0,05 (0,00) ^a	0,06 (0,00) ^b	0,06 (0,00) ^{ab}	0,06 (0,00) ^{ab}	0,05 (0,00) ^a	0,915	0,038	0,801
AGS*	57,93 (0,43) ^c	58,19 (0,16) ^c	58,27 (0,49) ^c	58,16 (0,77) ^c	53,87 (1,87) ^b	50,83 (0,17) ^{ab}	51,11 (0,20) ^{ab}	50,01 (0,56) ^a	0,000	0,053	0,024
AGMI	33,04 (0,43) ^a	32,64 (0,65) ^a	32,82 (0,69) ^a	32,66 (0,00) ^a	34,22 (2,14) ^b	35,95 (0,49) ^b	36,08 (0,53) ^b	36,91 (0,25) ^b	0,000	0,396	0,181
AGPI	4,47 (0,26) ^a	4,49 (0,02) ^a	4,44 (0,08) ^a	4,42 (0,15) ^a	7,69 (0,17) ^b	7,59 (0,14) ^b	7,55 (0,23) ^b	7,82 (0,07) ^b	0,000	0,743	0,594
n-6	2,90 (0,38) ^a	3,27 (0,02) ^a	3,24 (0,08) ^a	3,24 (0,16) ^a	5,69 (0,14) ^b	5,92 (0,11) ^b	5,84 (0,24) ^b	6,01 (0,04) ^b	0,000	0,098	0,888
n-3	0,56 (0,08) ^a	0,50 (0,02) ^a	0,50 (0,02) ^a	0,51 (0,00) ^a	1,37 (0,35) ^b	0,99 (0,03) ^b	1,05 (0,08) ^b	1,16 (0,01) ^b	0,000	0,187	0,476
n-6/n-3	5,29 (1,53)	6,52 (0,36)	6,62 (0,49)	6,36 (0,33)	4,37 (1,36)	5,97 (0,06)	5,57 (0,67)	5,16 (0,01)	0,068	0,146	0,968
18:2/18:3 (AL/ALA)	5,90 (1,65) ^b	7,31 (0,54) ^b	7,36 (0,64) ^b	6,92 (0,34) ^b	4,60 (1,53) ^a	6,35 (0,07) ^a	5,83 (0,76) ^a	5,35 (0,01) ^a	0,026	0,158	0,976

*Sumatorias: AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI ácidos grasos poliinsaturados; n-6: ácidos grasos n-6; n-3: ácidos grasos n-3.

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

5.7.7. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala industrial: TBARS

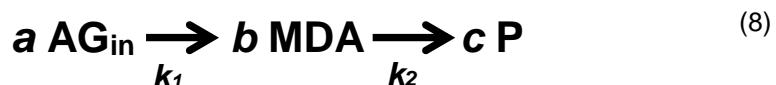
Como se discutió en la sección anterior, los AGPI que esterifican los fitoesteroles en la matriz del queso son vulnerables a la oxidación (McClements & Decker, 2000; Jacobsen, 2016). De acuerdo a los resultados que se muestran en la **Tabla 57**, la oxidación basal de los quesos control y funcional fue similar, con una tendencia no significativa a aumentar el nivel de TBARS en los quesos funcionales entre los 21 y 44 días de almacenamiento, para luego disminuir con un nivel de oxidación significativamente menor a los 47, 60 y 90 días en los quesos funcionales. Recordamos que esto en realidad no implica una disminución de la oxidación sino la complejación del MDA formado durante la lipoperoxidación, lo cual provoca que no pueda ser detectado por esta técnica al no estar disponible para reaccionar con el TBA (Caprioli et al., 2011; Schaich 2016; Zhang et al., 2018).

Tabla 57. Valores de TBARS (mEq MDA por kg de muestra) determinados en los quesos Por Salut *light* control y funcional obtenidos a escala industrial con fitoesteroles esterificados agregados. Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C; 80% de humedad relativa), envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo vida útil (días)	Control		Funcional	
7	0,10 ^a	± 0,05	0,14 ^{ab}	± 0,07
21	0,21 ^{de}	± 0,07	0,25 ^{bcd}	± 0,04
28	0,18 ^{bcd}	± 0,06	0,19 ^{cde}	± 0,07
44	0,20 ^{cde}	± 0,04	0,22 ^e	± 0,06
47	0,20 ^{cde}	± 0,02	0,16 ^{bcd}	± 0,03
60	0,22 ^e	± 0,05	0,16 ^{bcd}	± 0,04
76	0,20 ^{cde}	± 0,03	0,18 ^{bcd}	± 0,02
90	0,22 ^e	± 0,06	0,15 ^{bc}	± 0,04

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los resultados.

En la **Figura 55** se muestra la evolución de la concentración de MDA con respecto al tiempo de almacenamiento de los quesos Por Salut *light* control y funcional. En vista de los perfiles observados, se propuso explicarlos mediante una cinética de reacciones consecutivas de orden 1, donde los perfiles de la **Figura 55** serían para el reactivo intermedio, el MDA en este caso (8):



Suponemos que los coeficientes estequiométricos a , b y c valen 1. Con la letra “ P ” se simbolizan los productos siguientes de la oxidación. Las reacciones mencionadas parten del AG insaturado (AG_{in}), que se oxida (8). Como el MDA se determina analíticamente por el ensayo de TBARS, siendo un producto de oxidación secundario, se observó que su concentración decayó en el tiempo de acuerdo a

la cinética mencionada. Las líneas discontinuas en la **Figura 55** corresponden al modelo cinético ajustado. Se observa un máximo en el nivel de MDA al principio del almacenamiento, el cual se prolongó en el tiempo en el caso específico del queso funcional (**Fig. 55**). Se ve claramente la tendencia a una mayor acumulación de MDA en el queso funcional, para finalmente tender a igualarse los niveles en ambos quesos, después de los 60 días de almacenamiento.

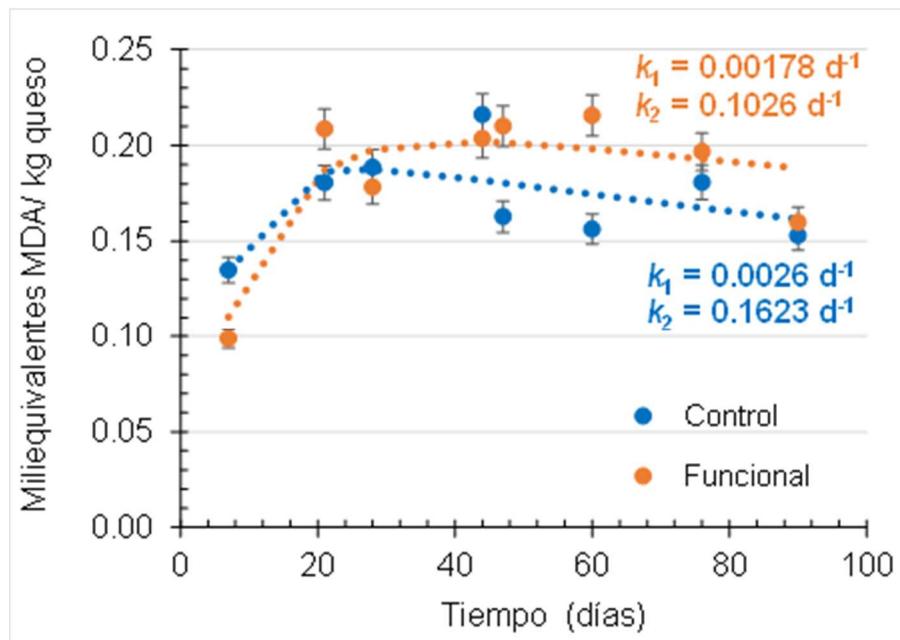


Figura 55. Incremento de los valores de malondialdehído (MDA) con el tiempo de vida útil a 4°C de los quesos Por Salut *light* control y funcional obtenidos a escala industrial sin y con agregado de fitoesteroles esterificados, respectivamente. Las líneas discontinuas corresponden al modelo cinético ajustado (ecuación 9) para queso Por Salut *light* control (•••••) y el funcional (○○○○○). Se muestran los valores de las constantes cinéticas k_1 y k_2 determinadas.

La ecuación cinética para las reacciones consecutivas planteadas (8) es la mostrada a continuación para el compuesto intermediario MDA (ecuación 9), donde r es la velocidad de reacción a volumen (V) constante:

$$r = \frac{1}{b} \frac{dn_{MDA}}{dt} \frac{1}{V} = \frac{1}{b} \frac{d[MDA]}{dt} = k_1 [AG_{in}] - k_2 [MDA] \quad (9)$$

Además, al coeficiente estequiométrico b se lo supone 1, n_{MDA} es el número de moles de MDA, t es el tiempo, $[AG_{in}]$ y $[MDA]$ son las concentraciones molares de AG_{in} (AG insaturados) y de MDA, respectivamente, resultantes del cociente del número de moles correspondiente sobre el volumen de reacción constante, n/V . Del ajuste de los resultados de la medición de la concentración de MDA según la cinética mencionada (ecuación 9), resultó que la constante cinética k_1 fue en ambos casos (queso control y queso funcional) cien veces menor, en cuanto a orden de magnitud, que la constante cinética k_2 . Ello significaría que la reacción global que lleva a la formación de MDA es mucho más lenta que la de desaparición del mismo (ecuación 8).

Cabe destacar que, si bien se observó un incremento en la oxidación de ambos productos (queso control y funcional) y que parecería adelantarse su aparición en los funcionales, los valores alcanzados se encuentran dentro de los rangos normales (0,1 y 1,5 mEq MDA por kg de muestra) reportados en la bibliografía (Kristensen et al., 2001; Mahmoodani et al., 2018).

5.7.8. Determinación de la oxidación de quesos elaborados a escala industrial: Valor peróxido

Los resultados que se presentan en la **Tabla 58** muestran que el queso funcional presentó valores más elevados de peroxidación lipídica desde el inicio, al igual que lo ocurrido en la elaboración a escala piloto, y con un incremento sostenido hasta el final de la vida útil dentro de cada tipo de queso. Al comparar entre los dos tipos de queso, control y funcional, este último sólo mostró mayor oxidación ($p<0,05$) a los 7, 21 y 90 días de maduración, mientras que el control la presentó a los 47 y 60 días (**Tabla 58**). Para el resto de los tiempos ensayados, no hubo diferencias significativas en el VP entre los quesos control y funcional.

Tabla 58. Valores peróxido (mEq O₂/kg de grasa) determinados en los quesos Por Salut *light* control y funcional obtenidos a escala industrial con fitoesteroles esterificados agregados. Evolución durante su tiempo de vida útil (4°C; 80% de humedad relativa), envasados en film impermeable al vapor de agua.

Tiempo vida útil (días)	Control		Funcional	
7	0,14 ^a	± 0,022	0,25 ^{cd}	± 0,016
21	0,18 ^{ab}	± 0,073	0,28 ^{def}	± 0,025
28	0,23 ^{bcd}	± 0,072	0,21 ^{abc}	± 0,058
44	0,27 ^{de}	± 0,053	0,29 ^{def}	± 0,017
47	0,34 ^f	± 0,072	0,23 ^{bcd}	± 0,057
60	0,33 ^{ef}	± 0,073	0,24 ^{bcd}	± 0,039
76	0,27 ^{bcd}	± 0,022	0,27 ^{cde}	± 0,050
90	0,26 ^{cd}	± 0,021	0,33 ^{ef}	± 0,071

¹Se indica la media aritmética y el desvío estándar ($n = 5$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre todos los resultados.

Tal como se viera para el MDA (**Fig. 55**), el VP para el queso control también evolucionó en el tiempo (**Fig. 56**) con un perfil que puede ser explicado también por la cinética mencionada (ec. 8), pero para los peróxidos primarios formados en vez de para el MDA. En este caso se ve en la **Figura 56** un máximo en el nivel del valor peróxido al principio del almacenamiento, el cual se prolongó en el tiempo evaluado. La línea discontinua corresponde al modelo cinético ajustado (ecuación 9). Del ajuste de los resultados de la medición del valor peróxido según la cinética mencionada (ecuación 9), resultó que la constante cinética k_1 fue, en el queso control, cien veces menor, en cuanto a orden de magnitud, que la constante cinética k_2 (**Fig. 56**), tal como se viera para ambos quesos con el MDA (**Fig. 55**). Ello

significaría que la reacción global que lleva a la formación de peróxidos, en este caso, es mucho más lenta que la de desaparición del mismo.

Por el contrario, en el caso del queso funcional, el VP aumentó con el tiempo, pudiendo ser estadísticamente ajustado según una cinética lineal (**Fig. 56**), lo cual se explicaría por un pseudo orden cero (ecuación 10):

$$r = \frac{1}{a} \frac{dn_{Px}}{dt} \frac{1}{V} = \frac{1}{a} \frac{d[Px]}{dt} = k \quad (10)$$

donde a es el coeficiente estequiométrico de la reacción de formación de peróxidos (Px), n_{Px} y $[Px]$ son, respectivamente, el número de moles y la concentración molar de peróxidos. Del ajuste de los resultados según la cinética mencionada (ecuación 10), resultó que la constante cinética k para el queso funcional es $2,9 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$ (**Fig. 56**). Ello significaría que la reacción global que lleva a la formación de peróxidos primarios por oxidación de los AG insaturados en el queso funcional es más rápida que la de formación de los peróxidos en el queso control ($k_1 = 1,581 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$).

De todos modos, y tal como se describió en los quesos elaborados a escala piloto, los valores obtenidos para cualquiera de los dos productos se encuentran dentro de lo esperable ($< 1 \text{ mEq/kg grasa}$) para este tipo de producto lácteo (Kristensen et al., 2001; García-Martínez et al., 2018).

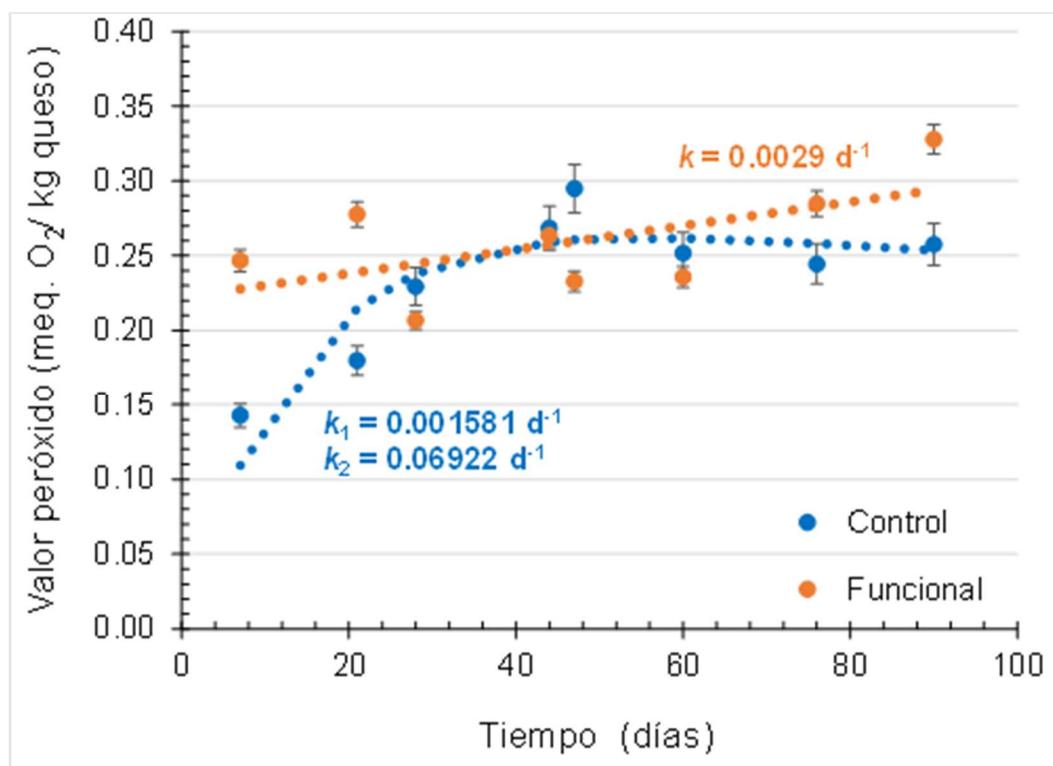


Figura 56. Incremento de los valores peróxido con el tiempo de vida útil a 4°C de los quesos Por Salut *light* control y funcional obtenido a escala industrial con fitoesteroles esterificados. Se muestran los valores de las constantes cinéticas (k_1 y k_2 : queso control; k : queso funcional) para las cinéticas respectivamente ajustadas (líneas discontinuas).

5.7.9. Vida útil de los quesos funcionales producidos a escala industrial

5.7.9.1. Medida de la oxidación lipídica durante el almacenamiento de quesos comerciales con bajo contenido de tocoferoles totales

Para hablar de este punto, se debe aclarar que se trabajó con una única elaboración industrial en donde se adicionó la mitad (15 g) de tocoferoles (sección 4.3), dando como resultado una concentración final de tocoferoles totales de 0,73 mg/60g de queso, esto es de 0,2 mg/60g de α -tocoferol y 0,63 mg/60g de γ -tocoferol en los quesos funcionales, mientras que en los quesos controles, el nivel de α -tocoferol fue de 0,09 y 0,02 mg/60g de queso y el de γ -tocoferol fue de 0,63 mg/60g de queso.

Como se comentó anteriormente, una vez elaborados, fraccionados y envasados en bolsas de polietileno termo contraíble (sección 4.9), los quesos, ya están disponibles para la venta luego de 21 días de maduración bajo almacenamiento refrigerado (4°C). Durante este período se da lugar a procesos de naturaleza química, bioquímica, microbiológica y física, constituyéndose el queso maduro. Estos cambios afectan la lactosa, la proteína y la grasa, tal como fuera explicado en la “Introducción” de esta tesis, y constituyen un ciclo de maduración que varía ampliamente entre los quesos duros, medio-blandos y blandos. Se producen diferencias considerables inclusive dentro de estos grupos. Estos procesos de maduración dan lugar a efectos deseables como el desarrollo del aroma, *flavor*, textura, pero además pueden desencadenarse procesos de oxidación (Karoui et al., 2007; Khattab et al. 2019; Ritota & Manzi, 2020).

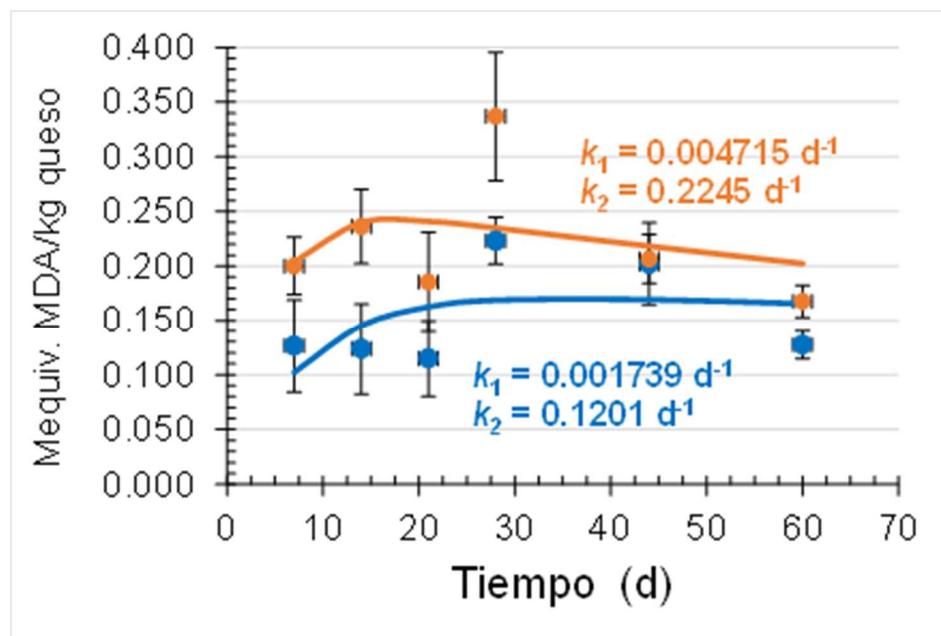


Figura 57. Cinética de oxidación o incremento de los valores de malondialdehído (MDA) con el tiempo de vida útil a 4°C de los quesos Por Salut *light* control y funcional obtenido a escala industrial con fitoesteroles esterificados y baja concentración de tocoferoles totales (0,73 mg/60 g queso). Las líneas continuas corresponden al modelo cinético ajustado para el queso Por Salut *light* control (azul) y el funcional (naranja). Se muestran los valores de las constantes cinéticas k_1 y k_2 determinadas.

Tal como fuera mostrado en la **Figura 56**, nuevamente los resultados reportados ahora en la **Figura 57** muestran que la concentración de MDA también evolucionó en el tiempo con un perfil que puede ser explicado por la cinética mencionada de reacciones consecutivas de primer orden (8). En este caso se ve en la **Figura 57** un máximo de nivel de MDA al principio del almacenamiento para el queso funcional, el cual luego disminuyó con el tiempo, mientras que para el queso control, el máximo aparece posteriormente al del queso funcional. Las líneas continuas corresponden al modelo cinético ajustado (ecuación 9). Del ajuste de los resultados de la medición de la concentración de MDA según la cinética mencionada (ecuación 9), resultó que la constante cinética k_1 fue, en ambos quesos, cien veces menor, en cuanto a orden de magnitud, que la constante cinética k_2 (**Fig. 56**), tal como se reportara previamente en la **Figura 55**. Ello significaría que la reacción global que lleva a la formación de MDA, en este caso, es mucho más lenta que la de desaparición del mismo. Las cinéticas de oxidación confirmaron un aumento de la oxidación lipídica durante el transcurso del madurado de los quesos control y funcional, para luego decaer hacia los 50 días, aun considerando la pérdida de humedad ocurrida durante el almacenamiento (**Fig. 57**).

Si bien, como se mencionó al principio de este punto, los contenidos iniciales de 0,2 mg/60g de α -tocoferol y 0,63 mg/60g de γ -tocoferol en los quesos funcionales fueron el doble y el triple de los determinados en los quesos controles, 0,09 y 0,02 mg/60g respectivamente, estos no fueron suficientes para contrarrestar el desarrollo de la oxidación.

5.7.9.2. Efecto de la adición de tocoferoles en los quesos producidos a escala industrial

Como consecuencia de lo observado en cuanto al nivel de oxidación del queso *Por Salut light* funcional en relación al control sin fitoesteroles (**Figs. 55, 56, 57**), se decidió agregar α -tocoferol como aditivo antioxidante natural a los quesos obtenidos industrialmente. Para ello se eligió una preparación comercial de tocoferoles (VITAMINA E NATURAL SF 900 UI®) (sección 4.3). El queso funcional así producido con el objetivo de proveer fitoesteroles nutricionales actuará simultáneamente como fuente parcial de tocoferoles (vitamina E), ya que el nivel propuesto de α -tocoferol (3,2 mg/60g de queso) en el queso funcional corresponde al 25% de la dosis diaria recomendada (DDR) de vitamina E.

Como se mencionó previamente, el α -tocoferol es también un mensajero secundario que a su vez podría potenciar el efecto antiaterogénico de los fitoesteroles a través del efecto hipolipemiante de estos últimos (Katan et al. 2003; Plat et al., 2005; Heggen et al., 2010).

Durante el transcurso de la primera elaboración a escala industrial se observó un aumento de la oxidación en los quesos funcionales. Esto se debe a la presencia de los AGPI de cadena larga con dos o más dobles enlaces ($\geq 18:2$) (**Tabla 56**). Estos ácidos son vulnerables a la oxidación, tal como se comentó en las secciones precedentes.

Los resultados presentados en la **Figura 58** muestran que el agregado de α -tocoferol fue efectivo para prevenir la oxidación a los 20 días de maduración del queso, que es el momento óptimo de salida del producto para la venta (Código Alimentario Argentino, Art. 625), tal como arriba fuera mencionado. En este caso se realizaron comparaciones entre dos elaboraciones de queso a escala

industrial con diferentes concentraciones de α -tocoferol agregadas para demostrar la eficacia de la adición del antioxidante a escala industrial. Este resultado es de importancia ya que hay pocos trabajos que demuestran que el agregado de α -tocoferol mejora la estabilidad a la oxidación de productos comerciales con fitoesteroles agregados (Botelho et al. 2014; O'Callaghan et al., 2014; Rudziniska et al., 2014), y que los tocoferoles que acompañan la preparación con FEE (Fig. 42) no alcanzaría para prevenir la oxidación de los productos lácteos (Figs. 55, 56, 57), la cual ocurre como consecuencia del aumento de casi el 100% de los ácidos grasos altamente peroxidables (Tabla 56) de los que los FEE son portadores (Tabla 29A).

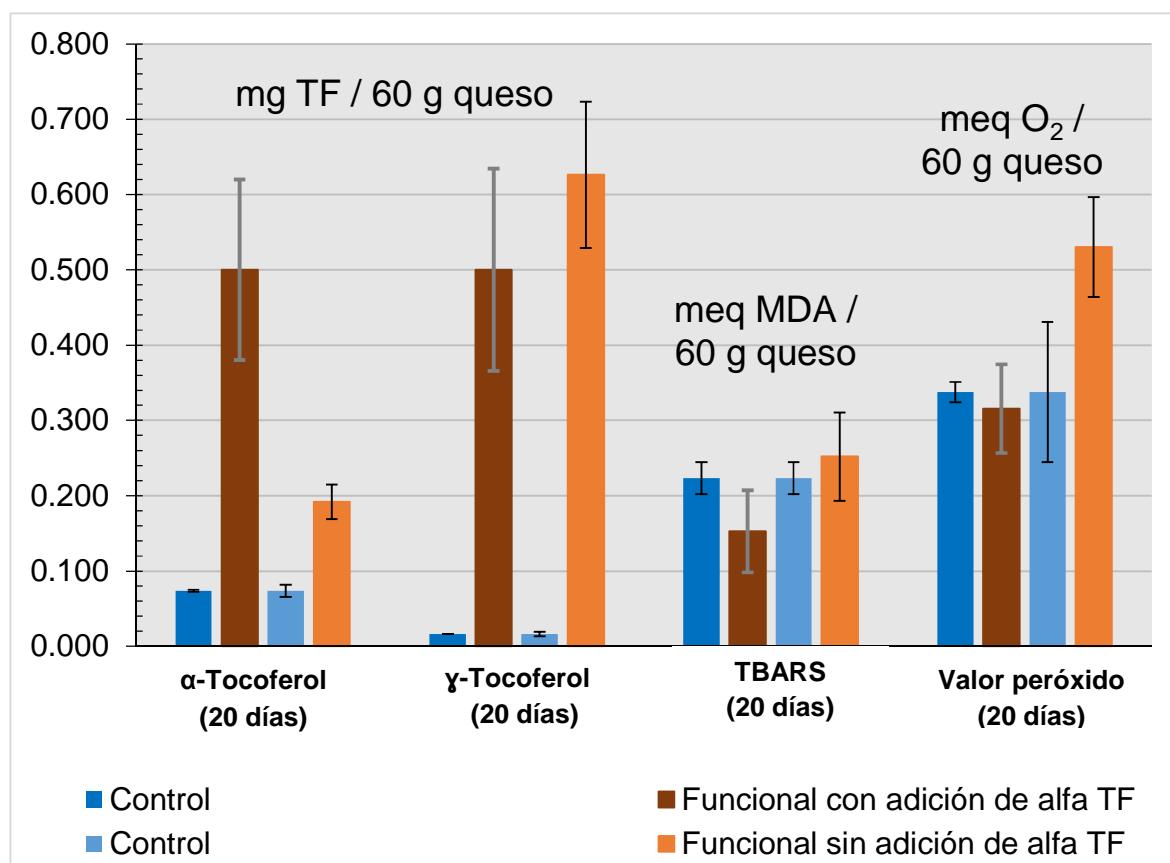


Figura 58. Concentración de α y γ Tocoferoles (TF) y valores de indicadores de oxidación (TBARS y valor peróxido) en las distintas elaboraciones a escala industrial de los quesos Por Salut *light* control y funcional, este último con fitoesteroles esterificados, a los 20 días de almacenamiento a 4°C.

El índice AGPI o de peroxidación (ecuación 1) resultó ser significativamente ($p<0,05$) mayor para los quesos funcionales (**Fig. 59**), lo que explicaría por qué estos últimos resultaron ser más vulnerables a la oxidación que los quesos control, sin fitoesteroles, de lo cual surgió la necesidad de incorporar antioxidantes naturales para contrarrestar este fenómeno.

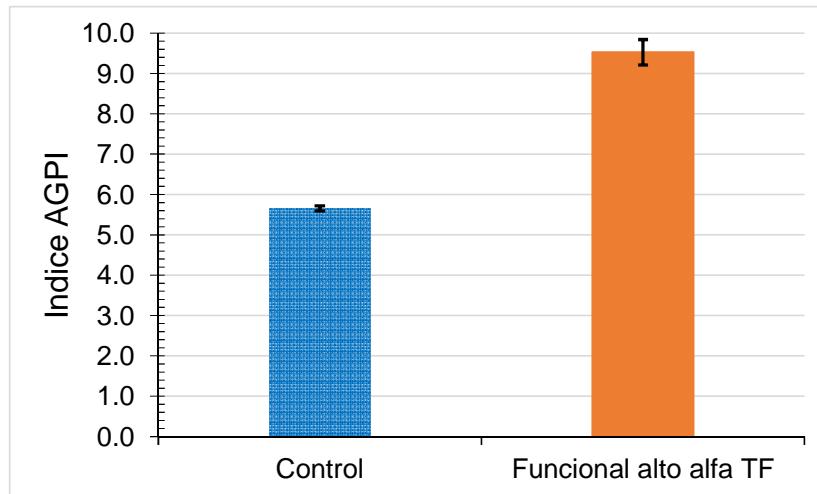


Figura 59. Índice AGPI (ecuación 1) calculado para los quesos elaborados a escala industrial Por Salut light control y funcional, este último con fitoesteroles esterificados agregados y con alfa-tocoferol agregado como aditivo antioxidante.

5.7.10. Microestructura de los quesos producidos a escala industrial

Con el objeto de determinar la homogeneidad de la distribución de los glóbulos de grasa en la matriz proteica del queso funcional, se realizó un estudio de la microestructura de los mismos y de los quesos control por microscopía óptica confocal. Para ello, se realizó la tinción selectiva de la grasa y de las proteínas de las muestras con los colorantes *Nile blue* y *Nile red*, respectivamente, lo cual permitió visualizar la fase grasa de color azul y la fase proteica de color rojo. Así, en la **Figura 60**, las imágenes **A** y **B**, correspondientes al queso control, muestran una matriz proteica continua de color rojo en la cual se ven distribuidas de manera homogénea gotas de color azul, por lo tanto, de grasa, con diámetros $\leq 1-10 \mu\text{m}$. En general, estos glóbulos de grasa láctea tienen una morfología similar y uniforme, observándose además que la mayoría de estas gotas son más bien de pequeño diámetro y sólo algunas poseen forma irregular o agrandada, lo cual podría deberse a fenómenos de coalescencia (flechas; **Fig. 60A**).

Por otro lado, las micrografías **C** y **D** (**Fig. 60**) muestran la matriz de los quesos funcionales. En concordancia con lo reportado por Auty et al. (2001), del análisis de imágenes surgen varios aspectos que vale la pena señalar. En primer lugar, el tamaño de las gotas de grasa es mayor a la observada en el queso control (**Fig. 60 A-B**), variando el diámetro de las mismas entre 3 y 25 μm . Además, se observa un mayor número de gotas grandes (flechas amarillas) sugiriendo que, en estos quesos, como consecuencia de la presencia de FEE en la fase grasa, habría una coalescencia llamativamente mayor, y que la matriz proteica se encuentra interrumpida en algunas zonas por la presencia de poros (aire) (flechas blancas). Otro resultado importante es que el porcentaje de gotas de grasa en las micrografías **C** y **D** es de aproximadamente 18% mientras que en las micrografías **A** y **B**,

correspondientes al queso control, es del 5%. Esto señala un incremento significativo ($p<0,05$) en la proporción de grasa en el queso funcional con respecto al queso control. Este resultado es lógico debido al aporte de grasa vegetal que conlleva la adición de fitoesteroles y al mayor contenido de grasa finalmente determinado en el queso funcional, tal como se muestra en la **Tabla 40**.

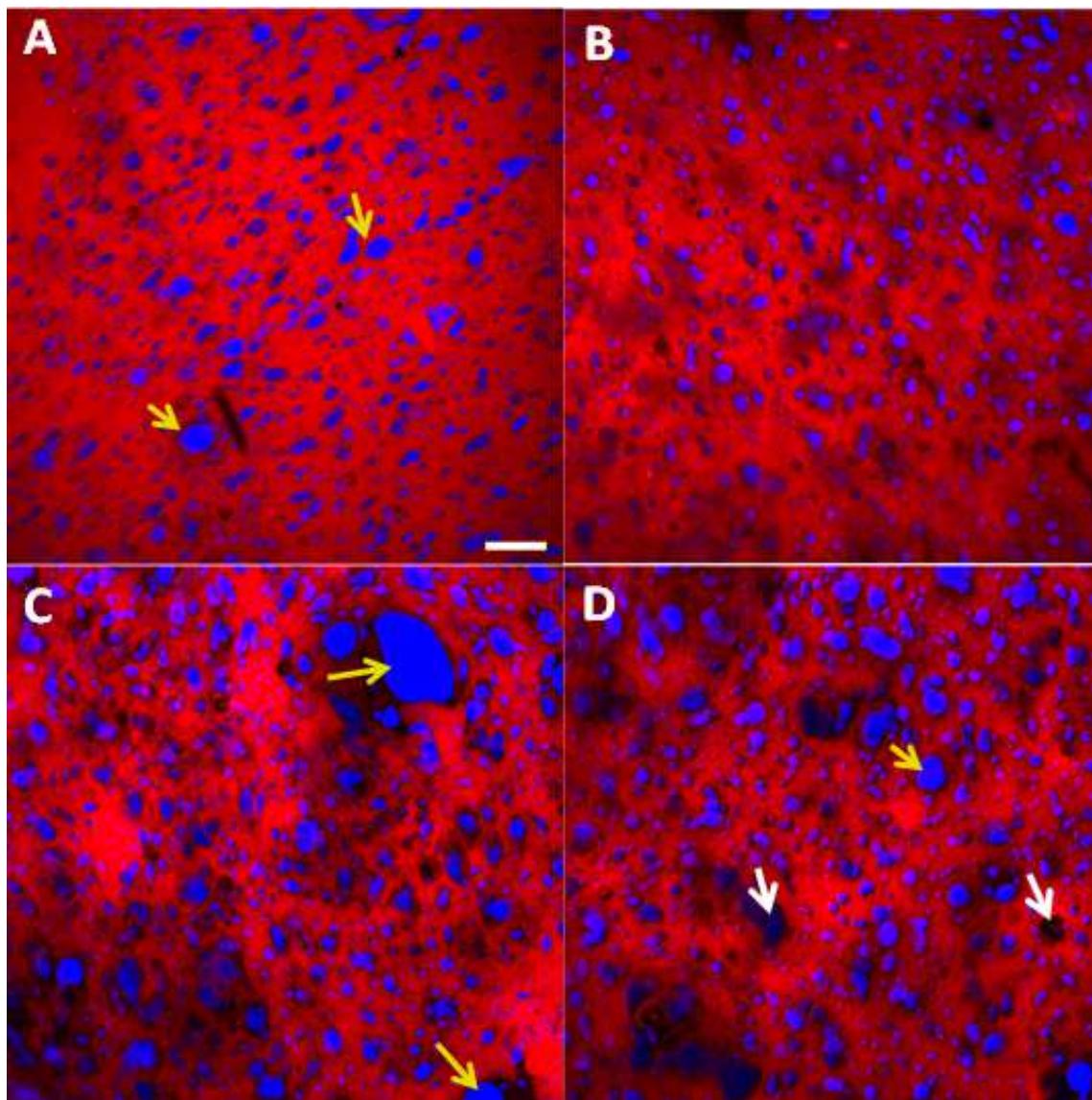


Figura 60. Imágenes obtenidas por microscopía óptica confocal de quesos Por Salut *light* control (**A**, **B**) y funcional (con agregado de fitoesteroles) (**C**, **D**), obtenidos a escala industrial, después de 7 días de maduración. Tinción con colorantes *Nile blue/Nile red*: azul corresponde a glóbulos de grasa; rojo corresponde a proteína; negro (flechas blancas) corresponde a aire o agua. Barra: 25 μ m.

Este incremento en el contenido de grasa, las características de la dispersión y el tamaño de las gotas de grasa, junto con la aparición de los huecos de aire en la matriz proteica pueden traducirse en diferencias texturales que se podrían explorar en ensayos futuros.

Las micrografías de la **Figura 60** corresponden a quesos control y funcional de 7 días de maduración. Además de estas, se tomaron micrografías de los mismos quesos a los 21 días de

maduración, pero no se observaron diferencias significativas en lo que respecta a la evolución de la matriz durante dicho tiempo (resultados no mostrados).

Ningtyas et al. (2017) estudiaron la textura y lubricación de queso crema funcional debido al agregado de fitoesteroles y/o beta-glucanos. Por microscopía confocal, los productos funcionales obtenidos exhibieron una estructura más abierta de la matriz de caseína, aunque se observaron diferencias en el tamaño de los glóbulos grasos. El queso crema elaborado con fitoesteroles emulsionados a partir de la forma en polvo disuelta en aceite de canola, dio como resultado un tamaño de glóbulo de grasa más grande que el de los fitoesteroles esterificados y que el adicionado con beta-glucanos. La distribución del tamaño de los glóbulos de grasa dispersos en la matriz proteica dio una distribución bimodal, con un tamaño de partícula mayor en el queso crema adicionado solamente con fitoesteroles.

D'Incecco et al. (2020) estudiaron el queso duro Parmigiano Reggianito durante una maduración prolongada de hasta 50 meses, relacionado esto con la calidad *Premiu*n del producto. Junto con la pérdida de humedad, la microestructura del queso observada por microscopía confocal se caracterizó por grasa libre atrapada en áreas de forma irregular dentro de la red de proteínas. Independientemente de la etapa de maduración del queso, la grasa estaba confinada en áreas irregulares de forma globular atrapadas dentro de la red de proteínas, lo que sugiere que dichas áreas se originan a partir de la coalescencia de glóbulos de grasa de diferentes tamaños. La coalescencia evolucionó durante la maduración, alcanzándose una distribución homogénea en la red proteica de los glóbulos, los cuales tienen además menor tamaño que en los primeros meses de almacenamiento. Por otro lado, el análisis de imágenes mostró que la porosidad del queso (huecos con aire) aumentaba significativamente con el tiempo desde los 12 a los 50 meses. Este hallazgo está de acuerdo con datos reportados por Soodam et al. (2015) para el queso Cheddar, donde la porosidad se consideró un efecto de la progresión de la proteólisis.

Yang et al. (2016) estudiaron las transformaciones microestructurales en la anisotropía y las propiedades de hilado por fusión del queso mozzarella parcialmente descremado con baja humedad. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal que muestran el eje longitudinal de la fibra de la mozzarella sin fundir, fundida y fundida e hilada. La mozzarella sin fundir mostró canales de grasa alargados en una matriz proteica, formando una estructura altamente anisotrópica. El calentamiento a 70 °C indujo la pérdida completa de la anisotropía estructural detectable a medida que los canales de grasa alargados se fusionaron para formar gotas de grasa esféricas grandes con relajación de la matriz proteica. Estas gotitas de grasa esféricas existían en una amplia gama de tamaños, desde menos de 10 micrones hasta tan grandes como 200 micrones de diámetro. Estas gotas grandes se alargaron en la dirección de la cizalla cuando se hiló la mozzarella y comenzaron a romperse cuando aumentó la tensión.

5.7.11. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de regresiones múltiples permite determinar las características de las muestras debidas al tratamiento y al tiempo de vida útil, al mismo tiempo que describe cuáles son los parámetros distintivos de los diferentes quesos. Este análisis determina las variables que más explican los fenómenos colineares que se dan en la matriz del alimento, a la vez que supervisa cuáles de ellas son más significativas a fin de predecir en forma cuantitativa el comportamiento de la matriz ante los cambios que puedan ocurrir al cambiar las condiciones.

Este tipo de análisis permite asociar cambios cuantitativos y cualitativos, que muchas veces no son detectables cuando se realizan las comparaciones de las variables individuales.

La influencia de la formulación del queso, control y funcional, sobre el tiempo de vida útil resultante y las características químicas en cada una de estas condiciones fue examinada aplicando análisis de componentes principales (PCA). Las características químicas listadas fueron los contenidos de y (**Tabla 51**) y de α -tocoferol (**Tabla 52**), los contenidos de AGMI, de n-3, de n-6, de AGPI y de AGS (**Tabla 56**), así como marcadores de oxidación tales como el VP (**Fig. 56**) y los miliequivalentes de MDA (TBARS) (**Fig. 57**). El PCA permite obtener información estadística relevante a partir de un conjunto de resultados que en este caso comprendió estas doce variables mencionadas, linealmente independientes, incluyendo aparte el tratamiento (queso control y funcional) y el tiempo de vida útil. También resalta semejanzas y diferencias. Muestras con propiedades o desempeños semejantes se ubicarán muy cercanas entre sí en el espacio de componentes principales, mientras que la distancia entre muestras considerablemente diferentes será especialmente mayor. Esto se puede observar en la **Figura 61** para el caso del presente trabajo. Como resultado, muestras similares se organizan en grupos en la misma región del espacio (Yang & Trewin, 2004). La gráfica de los resultados obtenidos en el presente estudio después de realizar el PCA, la cual resulta de representar los resultados del presente trabajo en las dos componentes principales (ejes X e Y), que explican la mayor proporción de la varianza total (>90%), es presentada en la **Figura 61**. Ella muestra que los quesos control se agruparon a la derecha (puntos azules), mientras que los quesos funcionales lo hicieron a la izquierda (puntos naranjas), y ambos en la zona positiva del eje X y negativa del eje Y, y localizados lejos del origen, relacionado con mayor varianza de acuerdo a las coordenadas de componentes principales. A su vez, en cada uno de estos dos grupos mayores, los resultados provenientes de quesos a tiempo 0 de almacenamiento se encuentran en el extremo inferior de cada grupo, mientras que los resultados obtenidos de muestras correspondientes a los quesos con el tiempo máximo de almacenamiento de 90 días, se encuentran en el extremo superior en ambos casos, separándose entonces hacia arriba a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento.

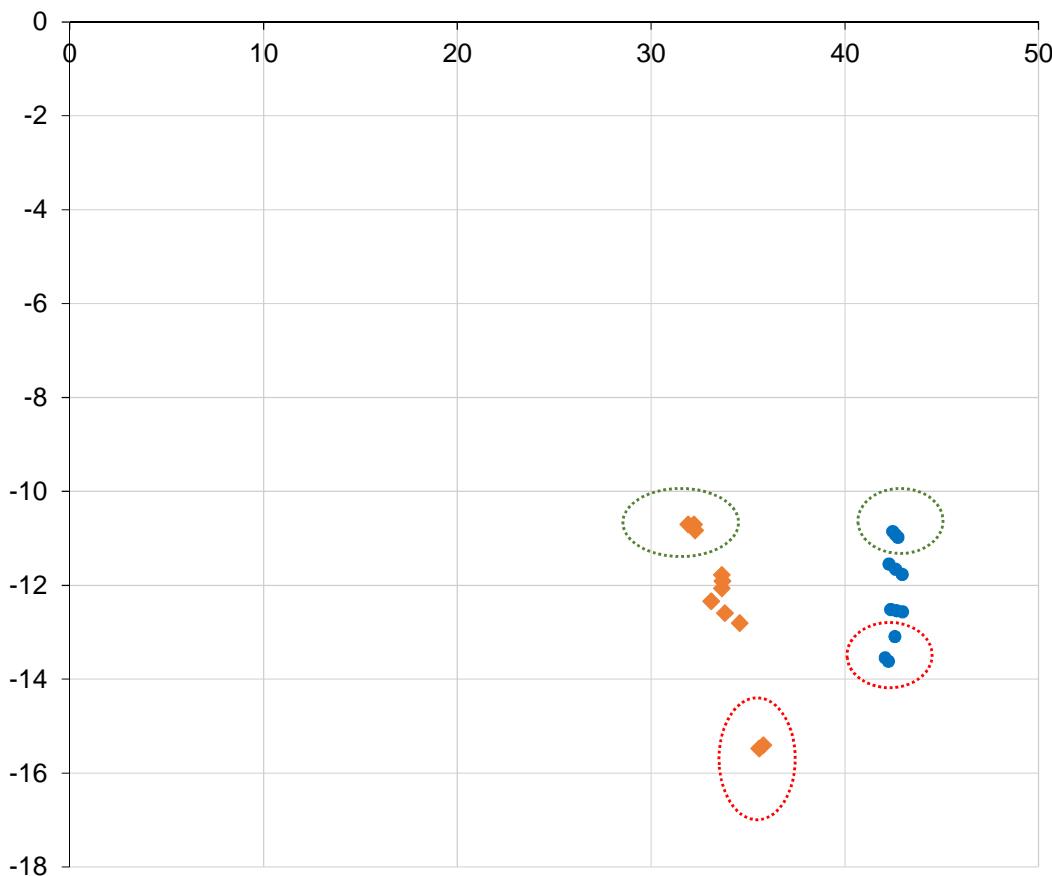


Figura 61. Gráfico resultante del análisis de componentes principales obtenido de las características de los quesos control (●) y funcional (◆) con alfa tocoferol agregado como aditivo antioxidante. Óvalos en líneas discontinuas rojas encierran los puntos correspondientes a tiempo 0 de almacenamiento a 4°C, mientras que los de líneas discontinuas verdes encierran los puntos correspondientes a tiempo final de almacenamiento (90 días).

Mediante este análisis se determinó que los quesos funcionales fueron diferentes a los quesos control, asociándose los quesos funcionales a la presencia de antioxidantes naturales (alfa y gama tocoferoles), a las mayores concentraciones de AGPI, de n-6 y, en particular, al contenido de ácido linolénico (ALA), influyendo el tiempo de maduración en las características del queso (**Fig. 61**).

En la **Tabla 59** se reportan solamente los resultados de las primeras cinco componentes ya que se observa claramente que desde la segunda componente principal ya explicó más del 90% del total de la varianza acumulada.

Tabla 59. Resultados del análisis de componentes principales usando las propiedades químicas determinadas en los quesos control y funcional (alfa tocoferol agregado como aditivo antioxidante) elaborados a escala industrial: contenidos de ácidos grasos saturados (AGS), de monoinsaturados (AGMI), de poliinsaturados (AGPI), de n-6, de n-3, valor peróxido, TBARS y contenidos de α -tocoferol y de γ -tocoferol.

PC ¹	Eigenvalues	Varianza (%)	Porcentaje de varianza acumulada
1	21.3699	87.3	87.3
2	1.73530	7.1	94.4
3	0.73028	3.0	97.4
4	0.57142	2.3	99.7
5	0.03547	0.1	99.9

¹Se muestran solamente los 5 primeros componentes principales (PC) sobre los 12 totales, ya que en el segundo PC ya se obtiene más del 90% de la varianza acumulada.

A modo de ejemplo, en la **Tabla 60** se muestran los dos primeros vectores que se usan de los doce, así como los coeficientes correspondientes a cada factor, esto es, los contenidos de α (ALFA) y de γ tocoferol (GAMA), de AGMI (MUFA), de n-3 (N3), de n-6 (N6), de AGPI (PUFA), de AGS (SFA), el TBARS (TBA) y el valor peróxido (VP), así como el tiempo de vida útil (TIME) y el tratamiento (TRAT), donde este último corresponde a “queso control” y “queso funcional” (con agregado de alfa tocoferol como aditivo antioxidante).

Tabla 60. Vectores (se muestran los dos primeros que se usan) y los coeficientes correspondientes a cada factor: contenidos de α -tocoferol (ALFA), de γ -tocoferol (GAMA), de AGMI (MUFA), de n-3 (N3), de n-6 (N6), de AGPI (PUFA), de AGS (SFA), TBARS (TBA) y valor peróxido (VP), así como tiempo de maduración (TIME) y tratamiento (TRAT), el cual corresponde a “queso control” y “queso funcional” (con agregado de alfa tocoferol como aditivo antioxidante).

FACTOR	1	2
ALFA	-0.3297	-0.1780
GAMA	-0.3066	-0.1454
MUFA	0.0519	0.2222
N3	-0.0654	-0.1002
N6	-0.2956	-0.0530
N6N3	0.0922	0.3991
PUFA	-0.3490	-0.1433
SFA	0.7481	-0.2810
TBA	0.0183	-0.0132
VP	0.0152	-0.0088
TIME	-0.0242	0.7893
TRAT	-0.1085	-0.0541

5.8. Etapa TRL 9: Producto comercial

Los resultados de esta tesis sirvieron para definir las condiciones de elaboración, sus propiedades nutricionales y la vida útil y conservación ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) del mismo.

El producto (**Fig. 62**) ha sido registrado bajo el número otorgado por la autoridad sanitaria de la provincia de Córdoba, Registro Nacional de Productos Alimenticios (RNPA) nº 04064284. Además, el producto y proceso industrial desarrollados han sido ambos patentados (INPI Nº 20150101287, del INTA), y la empresa CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A. es la licenciataria exclusiva de la misma por el momento.



Figura 62. Queso Port Salut *light* funcional por el agregado de fitoesteroles esterificados a través de la leche estandarizada en su contenido graso. El mismo contiene alfa tocoferol agregado como aditivo antioxidante natural para asegurar su estabilidad oxidativa, que al mismo tiempo aporta el 25% de la dosis diaria recomendada en vitamina E.

El queso elaborado se vende a través de diferentes canales de la empresa, los que incluyen una plataforma online (Quesosonline.com) y canales de venta directa al público en Villa María (Córdoba). Este queso está registrado y sale con las siguientes especificaciones técnicas:

INGREDIENTES: Leche parcialmente descremada, Cultivo de bacterias lácticas específicas, Cuajo, Cloruro de calcio y Cloruro de Sodio. Fitoesteroles y vitamina E.

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL: Porción 30 g (1 rebanada). Valor energético 79 Kcal = 326 KJ (4 %VD*); Carbohidratos 0,4 g (0%VD); Proteínas 6,5 g (9 %VD); Grasas totales 5,6 g (10 %VD); Grasas saturadas 3,7 g (17 %VD); Sodio 178 mg (7 %VD); vitamina E 3,1 mg (31%VD); fitoesteroles 1,1 g. No aporta cantidades significativas de Carbohidratos, Grasas trans y Fibra alimentaria. (*) Valores Diarios con base a una dieta de 2.000 Kcal u 8.400 KJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas.

CONSERVACIÓN: 60 días, a temperatura de refrigeración entre 2 y 8° C.

PRESENTACIÓN: Hormas de 500 g, aproximadamente, envasadas al vacío y embaladas en cajas cada una conteniendo 12 unidades.

5.9. Discusión y conclusiones de las elaboraciones a escala industrial: Etapas TRL 6 a 8.

Los ensayos realizados en quesos funcionales y control a lo largo de diferentes elaboraciones industriales realizadas entre 2011 y 2017 permitieron el monitoreo y ajustes de los procedimientos directamente en la planta industrial. De este modo se logró bloquear a las distintas variables que podrían presentarse en esta escala (distintas composiciones en las dietas de las vacas lecheras, diferente composición de las leches obtenidas, distintas variables industriales, etc.) y así lograr una representatividad en las elaboraciones.

Los parámetros físico-químicos y microbiológicos de las leches crudas utilizadas para ambos tratamientos (control y funcional), antes y después de la estandarización por cantidad de grasa y proteína, fueron similares y permitieron partir de materias primas de calidad óptima y controlada para elaborar estos tipos de queso. El procedimiento de las elaboraciones siempre se mantuvo igual. Las producciones de queso con fitoesteroles se realizaban después de las elaboraciones convencionales como medida de buenas prácticas en la industria.

El logro del queso funcional a escala industrial y comercial, con un contenido de 2,2 g de FEL, que además contiene 6,2 mg de alfa-TF como aditivo antioxidante cada 60 g de queso, implicó realizar al final el trámite de protección del producto a través de una patente en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI). Así es como, registrado bajo el número de patente 20150101287, fijado por el INPI, con el título: "Queso magro de pasta blanda que comprende fitoesteroles y procedimiento de elaboración", se protege no solamente al producto sino también a la manera de producirlo.

Las diferencias que presentaron los quesos a nivel químico se dieron fundamentalmente en la composición y perfil de ácidos grasos, en la concentración de tocoferoles y en el contenido de grasa final, ya que los quesos funcionales tienen los lípidos vegetales agregados con los FEE (Advasterol éster®).

La adición de α -tocoferol hasta alcanzar 6 mg de tocoferoles totales tuvo el objetivo de contrarrestar la labilidad del producto funcional a la oxidación debida a los AGPIs que contiene (**Tabla 56**). Se eligió este antioxidante por estar ya naturalmente presente en la leche utilizada (**Tabla 41; Fig. 42**), aprovechándose además a contribuir a la dieta de los consumidores con el aporte de vitamina E natural en 3,1 mg/30g de queso (ingesta diaria recomendada: 15 mg/día).

En cuanto a otros compuestos bioactivos determinados como el retinol y el β -caroteno, sus niveles resultaron muy bajos en todos los quesos ($\approx 0,05$ mg de retinol/60 g; máximo de 0,02 mg de β -caroteno/60 g) como para poder definirlos como fuente de los mismos. Se requieren 0,8 mg de retinol y aproximadamente 4,8 mg de β -caroteno como recomendaciones de ingesta diaria (Grune et al., 2010).

Este punto es importante ya que los tocoferoles (más polares) se ubican en las membranas de los glóbulos de grasa mientras que el β -caroteno y el retinol (no polares) se encuentran dentro de los glóbulos de grasa. Como la leche no se homogeneiza, la presencia de estos compuestos correctamente biolocalizados y de acuerdo a su polaridad en el glóbulo graso podrían servir para prevenir la oxidación (McClements & Decker, 2000; Fiedor et al., 2014) durante el procesamiento, aun cuando están presentes en cantidades minoritarias.

Con respecto a la diferencia en el contenido de β -caroteno en los quesos control vs. funcional (0,02 vs 0,004 mg/60g queso), podríamos postular que el β -caroteno se consume ejerciendo esa actividad antioxidante (captura de oxígeno singlete) en un ambiente con mayor índice de peroxidación debido a la presencia de los AGPIs, fácilmente oxidables. Otra posibilidad podría ser el desplazamiento del β -caroteno por los fitoesteroles en el glóbulo de grasa durante el procesamiento. Hasta el momento no se ha demostrado esta posibilidad de interacción antagónica entre fitoesteroles y β -caroteno en leche, pero existe evidencia científica (Baumgartner, 2017) de una interferencia a nivel de la formación de micelas mixtas y su posterior absorción intestinal.

Estas líneas abren la posibilidad a estudios más profundos de interacción de fitoesteroles con otros micronutrientes y compuestos bioactivos para la formulación de alimentos funcionales conteniendo leche y fitoesteroles.

Se determinó que los quesos funcionales fueron diferentes a los quesos control debido a la presencia de antioxidantes naturales (α -tocoferol), a las mayores concentraciones de AGPI y de n-6 y al contenido significativo de ácido linolénico (ALA), influyendo además el tiempo de maduración en las características del queso.

Finalmente, esta etapa concluyó con el queso a nivel comercial, cumpliéndose los diferentes niveles de madurez tecnológica (TRL) que van desde el prototipo de laboratorio hasta el modelo comercial.

6. Conclusiones generales y perspectivas

- Ensayos a escala laboratorio (etapas TRL 3 y 4)

En este paso se inició la combinación de la investigación y el desarrollo. Esta etapa incluyó estudios analíticos para establecer la tecnología en un contexto apropiado y estudios de laboratorio de validación para constituir el “prototipo” de las aplicaciones y conceptos formulados en la hipótesis experimental.

Como primer punto se exploró el tipo de fitoesteroles a utilizar entre los productos disponibles en el mercado (libres, esterificados y emulsificados).

También se logró la optimización metodológica para la extracción, recuperación y cuantificación de los compuestos de interés en las diferentes matrices (leche, crema y queso), con excelentes recuperaciones de los compuestos.

Se realizaron los prototipos a escala laboratorio, la cual implicó un volumen máximo de 1 litro de leche, ensayando la inclusión de los fitoesteroles mediante la leche y mediante la crema.

Se analizaron los resultados de recuperación de los fitoesteroles adicionados en diferentes concentraciones a fin de determinar las mejores condiciones de adición-recuperación y se demostró que la adición a la leche resultó ser la más conveniente en cuanto al desempeño tecnológico, la facilidad de trabajo y la posibilidad de pasteurización sin perder la actividad funcional de los fitoesteroles. A partir del prototipo validado se pasó a la escala piloto para determinar los requisitos de las aplicaciones potenciales del sistema.

- Ensayos a escala piloto en un volumen de 180 litros (etapas TRL 5 y 6)

Los elementos tecnológicos básicos se integraron a fin de simular las condiciones lo más reales posibles. El prototipo se probó en un entorno relevante equipado para tal fin como lo es la planta piloto de la EEA-Rafaela de INTA, que procesa un volumen de 180 litros de leche.

A partir de esta etapa se determinó el modo de adición de los compuestos bioactivos (FEE y tocoferol) directamente al tanque pulmón, previo a la pasteurización mediante intercambiador de placas con bombas sanitarias y demás equipamiento de características industriales.

Se demostró que la adición en crema resultó en la desestabilización del producto mientras que la adición en leche resultó en un queso homogéneo y con mejores rendimientos para la recuperación de fitoesteroles y tocoferoles (2,7 g y 0,48 mg/60 g de queso, respectivamente), logrando la concentración buscada en el caso de los fitoesteroles.

- Ensayos a escala industrial en un volumen de 2500 litros (etapas TRL 7 a 9)

Durante esta etapa, realizada en la planta de la empresa asociada al proyecto, se demostró el funcionamiento del prototipo real en un ambiente real planificado. Se realizaron las correcciones para demostrar que el modelo funcionó a escala industrial. Durante los ensayos de vida útil a lo largo de cinco elaboraciones se ajustaron las condiciones para generar un medio antioxidante que permitiera la correcta conservación del queso funcional a una temperatura de 4°C.

Estas elaboraciones mostraron una repetitividad en el tiempo, además de llegar a la concentración óptima objetivo de fitoesteroles libres ($\approx 2,42$ g FEL) por cada 60 g de queso o dos porciones (30 g cada una), tal como se recomienda para su consumo, aportando además 130 mg del ácido graso esencial ALA, precursor de los ácidos grasos de la serie n-3. La adición de los compuestos bioactivos (FEE, α -TF) en la etapa del proceso que se estableció (tanque pulmón), permitió que los compuestos no sólo se incorporaran satisfactoriamente sino que, además, superaran el paso de pasteurización, garantizando la inocuidad integral del producto desarrollado.

En esta etapa se trabajó con el personal de la planta industrial a fin de protocolizar la adición de los compuestos bioactivos, sin variar sustancialmente los procedimientos utilizados en la industria. Tampoco afectó el normal desarrollo de las tareas de limpieza sucesivas y habituales que se llevan adelante luego de cada elaboración.

Se demostró que los contenidos de fitoesteroles y de tocoferoles se mantuvieron intactos por 90 días de almacenamiento refrigerado a una temperatura de 4°C (la vida útil convencional de los quesos "Por Salut" es de 60 días).

Además, la microestructura del queso mostró que se logró una distribución homogénea de los lípidos endógenos y los adicionados a la matriz.

El producto obtenido se encuentra patentado (INPI N° 20150101287), lo cual protege no solamente al producto sino también a la metodología de elaboración. Además de esto, el producto se encuentra inscripto en el Registro Nacional de Productos Alimenticios (RNPA) bajo el n° 04064284.

Se obtuvieron menciones en los premios ArgenINTA 2016, APSAL 2018 e Innovar 2018 por el desarrollo conjunto del producto entre una PyME y un equipo de investigación.

El queso funcional con fitoesteroles se comercializa actualmente a través de una plataforma web y en comercios conocidos como "dietéticas", ya que es una alternativa para el cuidado de la salud de las personas moderadamente hipercolesterolémicas.

Los resultados de esta tesis han abierto un camino a la innovación por asociación entre el INTA y la industria. Actualmente se está trabajando en nuevos desarrollos de quesos diferenciados funcionales con la misma empresa (CDS-Lácteos Capilla del Señor S.A.) y con otros grupos de investigación asociados.

7. Bibliografía

- Afonso, S., Machado, R., Lavrador, M.S., Rocha Quintao, E.C., Moore, K.J., Lottenberg, A.M. (2018). Molecular pathways underlying cholesterol homeostasis. *Nutrients.* 10, 760. <http://doi:10.3390/nu10060760>
- Agarwal, M., Parameswari, R.P., Vasanthi, H.R., Das, D.K. (2012). Dynamic Action of Carotenoids in Cardioprotection and Maintenance of Cardiac Health. *Molecules.* 17, 4755-4769. <https://doi.org/10.3390/molecules17044755>
- Agarwal, S., McCoy, D., Graves, W., Gerard, P.D., Clark, S. (2011). Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and process cheeses varies considerably in the United States. *Journal of Dairy Science.* 94(3), 1605-1615. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3782>
- Aguilera, C., Labbé, T., Busquets, J., Venegas, P., Neira, C., Valenzuela, A. (2019). Obesity: risk factor or primary disease?. *Revista médica de Chile.* 147(4). <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872019000400470>
- Ahangarpour, A., Sayahi, M., Sayahi, M. (2019). The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes Metab Syndr.* 13(1), 854-857. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.051>
- Akersk, M. R., Bauman, D. E., Capuco, A. V., Goodman, G. T., & Tucker, A. H. (1981). Prolactin regulation of milk secretion and biochemical differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology.* 109, 23-30. <https://doi.org/10.1210/endo-109-1-23>
- Al-Suod, H., Gadzała-Kopciuch, R., Buszewski, B. (2018). Simultaneous HPLC-ELSD determination of sugars and cyclitols in different parts of *Phacelia tanacetifolia* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology.* 80, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.06.003>
- Amaral, A.B., da Silva, M.B., da Silva Lannes, S.C. (2018). Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. *Food Sci. and Technol.* 38(1), 1-15. <https://doi.org/10.1590/fst.32518>
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis.* Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists International.
- Auty, M.A.E., Twomey, M., Guinee, T. P., Mulvihill, D.M. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *The Journal of dairy research.* 68(3), 417. <https://doi.org/10.1017/s0022029901004873>
- Avila-Sosa, R., Montero-Rodríguez, A.F., Aguilar-Alonso, P., Vera-López, O., Lazcano-Hernández, M., Morales-Medina, C., Navarro-Cruz, A.R. (2019). Antioxidant Properties of Amazonian Fruits: A Mini Review of In Vivo and In Vitro Studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 1-11. <https://doi.org/10.1155/2019/8204129>

- Azzi, A. (2019). Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biology*. 26, 101259. <https://doi: 10.1016/j.redox.2019.101259>
- Baars, T., Schröder, M., Kusche, D., Vetter, W. (2012). Phytanic acid content and SRR/RRR diastereomer ratio in milk from organic and conventional farms at low and high level of fodder input. *Organic Agriculture*. 2, 13-21. <https://doi.org/10.1007/s13165-012-0021-z>
- Baccifava, R.L., Palombarini, J., Kivatinitz, S.C. (2016). Rendimiento quesero. su predicción como una herramienta para evaluar el proceso de elaboración. *Revista Tecnología y Ciencia*. 30, 7-16. <http://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/130>
- Baró Rodríguez, L., Villoslada, F.L., Corral R. (2010). Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Leche y derivados lácteos. 2, 1-26. ISBN 978-84-9835-347-1
- Baumgartner, S., Ras, R.T., Trautwein, E.A., Mensink, R.P., Plant, J. (2017). Plasma fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations after plant sterol and plant stanol consumption: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Nutr.* 56, 909-923. <https://doi/10.1007/s00394-016-1289-7>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K.B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., Martin, C. (2018). Familial hypercholesterolemia: the most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3426. <https://doi.org/10.3390/ijms19113426>
- Bergamaschi, M., Bittante, G. (2018). From milk to cheese: Evolution of flavor fingerprint of milk, cream, curd, whey, ricotta, scotta, and ripened cheese obtained during summer Alpine pasture. *J. Dairy Sci.* 101, 3918-3934. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13573>
- Berry, S., Sheehy, P., Williamson, P., Sharp, J., Menzies, K., Lefèvree, C., Digby, M., Harland C., Davis, S., Snell, R. (2020). Chapter 4 - Defining the origin and function of bovine milk proteins through genomics: The biological implications of manipulation and modification. *Milk Proteins* (Third Edition) From Expression to Food. 143-171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00004-9>
- Bigliardi, B., Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*. 31, 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006>
- Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchi, R., Nardone, G., De Devitiis, B., Carluccif, D. (2017). Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. *Appetite*. 113, 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.031>
- BioActive Substances in Food Information System. (2017). <https://ebasis.eurofir.org/Default.asp>
- Blaner, W.S. (2019). Vitamin A and provitamin A carotenoids. *Present Knowledge in Nutrition*. 73-91. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00005-6>
- Bocquel, D., Marquis, R., Dromard, M., Salamin, P.A., Rey-Siggen, J., Héritier, J., Kosinska-Cagnazzo, A., Andlauer, W. (2016). Effect of flaxseed supplementation of dairy cows' forage on physicochemical

- characteristic of milk and Raclette cheese. Int. J. Dairy Technol. 69, 129-136. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12235>
- Botelho, P.B., Galasso, M., Dias, V., Mandrioli, M., Lobato, L.P., Rodriguez-Estrada, M.T., Castro, I.A. (2014). Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate. LWT - Food Science and Technology. 55, 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.002>
- Boulet, L., Alex, B., Clavey, N., Martinez, J., Ducros, V. (2020). Simultaneous analysis of retinol, six carotenoids, two tocopherols, and coenzyme Q10 from human plasma by HPLC. Journal of Chromatography. 54(2), 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122158>
- Brew, K. (2012). α -Lactalbumin. Advanced Dairy Chemistry. 261–273. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_8
- Brown, W., Smith, F.E. (1964). Process for Separating Tocopherols and Sterols From Deodorizer Sludge and the Like. US Patent 3.153.055.
- Burrow, K., Young W., Carne, A., McConnell, M., El-Din Bekhit, A. (2019). Interactions of Milk Proteins With Minerals Encyclopedia of Food Chemistry. 395-403. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22489-X>
- Buttriss, J.L., Diplock, A.T. (1984). High-Performance Liquid Chromatography Methods for vitamin E in tissues. Methods in Enzymology. 105, 131-138. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05018-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05018-7)
- Buys, E.M. (2011). Enzymes Indigenous to Milk: Lactoperoxidase. Encyclopedia of Dairy Sciences. 319-323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00160-6>
- Caprioli, I., O'Sullivan, M., Monahan, F.J. (2011). Interference of sodium caseinate in the TBARS assay. Food Chemistry. 124(3), 1284-1287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.022>
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. Food and Chemical Toxicology. 107, 302-317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. Trends in Food Science & Technology. 71, 107-120. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>
- Catala, A. (2012). Lipid Peroxidation. BoD–Books. <http://dx.doi.org/10.5772/2929>
- Chandan, R. C. & Kapoor, R. (2011). Manufacturing Outlines and Applications of Selected Cheese Varieties. Dairy Ingredients for Food Processing. 11, 267-316. <https://doi.org/10.1002/9780470959169.ch11>
- Cheese Market–Latest Industry Trends and Global Insights 2018-2025. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/GlobalCheeseMarket.pdf>

- Chen, L., Teng, H., Xie, Z., Cao, H., San Cheang, W., Skalicka-Woniak, K., Georgiev, M.I., Xiao, J. (2018). Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 58(4), 513-527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1196334>
- Chisté, M.F.A., Zerlotti, M., Fernandes, E. (2014). Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. *Life Sciences.* 99, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.059>
- Choi, J., Horne, D.S., Lucey, J.A. (2007). Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science.* 90(6), 2612-2623. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-814>
- Christ, A., Lauterbach, M., Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity.* 51, 794-811. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control.* 42, 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. InfoLEG, Información Legislativa. (2004). Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Resolución Conjunta 40/2004-SPRRS y 298/2004-SAGPA. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/90000-94999/93132/norma.htm>
- Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII: Alimentos Lácteos https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteos_actualiz_2020-01.pdf
- Cömert, E.D., Gökm̄en, V. (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International.* 105. 76-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.056>
- Cong, S., Dong, W., Zhao, J., Hu, R., Long, Y., Chi, X. (2020). Characterization of the lipid oxidation process of robusta green coffee beans and shelf life prediction during accelerated storage. *Molecules.* 25, 1157. <https://doi.org/10.3390/molecules25051157>
- Coppa, M., Chassaing, C., Sibra, C., Cornu, A., Verbič, J., Golecký, J., Engel, E., Ratel, J., Boudon, A., Ferlay, A., Martin, B. (2019) Forage system is the key driver of mountain milk specificity. *J. Dairy Sci.* 102, 10483-10499. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16726>
- Corzo, L., Fernández-Novoa, L., Carrera, I., Martínez, O., Rodríguez, S., Alejo, R., Cacabelos, R. (2020). Nutrition, health, and disease: role of selected marine and vegetal nutraceuticals. *Nutrients.* 12(3), 747. <https://doi.org/10.3390/nu12030747>

- da Silva, A., Caldas, A.P.S., Hermsdorff, H.H.M. (2019). Triglyceride-glucose index is associated with symptomatic coronary artery disease in patients in secondary care. *Cardiovasc. Diabetol.* 18, 89. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0893-2>
- de la Fuente, M.A., Rodríguez-Pino, V., Juárez, M., (2015). Use of an extremely polar 100-m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles. *International Dairy Journal.* 47, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.02.010>
- Descalzo, A.M., Rossetti, L., Páez, R., Grigioni, G., García, P.T., Costabel, L., Negri, L., Antonacci, L., Salado, E., Bretschneider, G., Gagliostro, G., Comerón, E. and Taverna, M.A. (2012). Differential Characteristics of Milk Produced in Grazing Systems and Their Impact on Dairy Products. *Milk Production – Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health.* 15, 338-368. <https://doi.org/2F10.5772%2F50760>
- D'Incecco, P., Limbo, S., Hogenboom, J., Rosi, V., Gobbi, S., Pellegrino, L. (2020). Impact of Extending Hard-Cheese Ripening: A Multiparameter Characterization of Parmigiano Reggiano Cheese Ripened up to 50 Months. *Foods.* 9, 268. <https://doi.org/10.3390/foods9030268>
- Diplock, A. T. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition.* 81, 1-27. <https://doi.org/10.1079/BJN19990002>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W. y Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants.* 8(10), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. (2020). An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *Journal of Functional Foods.* 68, 103896. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103896>
- EFSA. (2010). Scientific Opinion. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal.* 8(10), 1813. <https://efsajournal.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2010.1813>
- El Sohaimy, S.A. (2012). Functional foods and nutraceuticals - modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal.* 20, 691-708. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.20.05.66119>
- Ergönül, P. G. & Köseoğlu, O. (2014). Changes in α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents of mostly consumed vegetable oils during refining process. *Journal of Food.* 12(2), 199-202. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.821672>
- Esche, R., Scholz, B., Engel, K. H. (2013). Online LC–GC Analysis of Free Sterols/Stanols and Intact Steryl/Stanyl Esters in Cereals. *J. Agric. Food Chem.* 61(46), 10932-10939 <https://doi.org/10.1021/jf403046z>

- Estévez, M., Xiong, Y. (2019). Intake of oxidized proteins and amino acids and causative oxidative stress and disease: Recent scientific evidences and hypotheses. *Journal of food science*. 84(3), 387-396. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.14460>
- European Parliament and of the Council. (1997). Reglamento (CE) nº 258/97. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A31997R0258>
- Everett, D., Guinee, T.P., Johnson, M.E. (2014). The importance of salt in the manufacture and ripening of cheese: Cheese structure and functionality. Special Issue of the International Dairy Federation. SI-1401, Brussels, Belgium. <https://store.fil-idf.org/product/the-importance-of-salt-in-the-manufacture-and-ripening-of-cheese-2/>
- Fagan, C.C., O'Callaghan, D.J., Mateo, M.J., Dejmek, P. (2017). Chapter 6: The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd. *Cheese*. 145-177. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00006-5>
- Fan, R., Kim, J., You, M., Giraud, D., Toney, A.M., Shin, S-H., Kim, S.Y., Borkowski, K., Newman, J.W., Chung, S. (2020). α -Linolenic acid-enriched butter attenuated high fat diet-induced insulin resistance and inflammation by promoting bioconversion of n-3 PUFA and subsequent oxylipin formation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 76, 108285. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108285>
- Falguera, V., Aliguer, N., Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products?. *Food Control*. 26(2), 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.051>
- Fardet, A., Morise, A., Kalonji, E., Margaritis, I., & Mariotti, F. (2017). Influence of Phytosterol and Phytostanol Food Supplementation on Plasma Liposoluble Vitamins and Provitamin A Carotenoid Levels in Humans: An Updated Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. <http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1033611>
- FDA. (2008). 21 CFR, Part 101.61. Nutrient content claims for the sodium content of foods. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Washington, DC. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=101>
- FDA. (2012). Health Claim; Phytosterols and Risk of Coronary Heart Disease. <https://www.federalregister.gov/documents/2012/02/21/2012-3940/health-claim-phytosterols-and-risk-of-coronary-heart-disease>
- FDA (2019). Converting units of measure for folate, niacin, and vitamins a, d, and e on the nutrition and supplement facts labels: guidance for industry. <https://www.fda.gov/media/129863/download>
- Fenaille, F., Mottier, P., Turesky, R.J., Ali, S., Guy, P.A. (2001). Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of Chromatography A*. 921(2), 237-245. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00883-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00883-4)

- Fernández-Pérez, E.J., Sepúlveda, F.J., Peters, C., Bascuñán, D., Riffo-Lepe, N.O., González-Sanmiguel J., Sánchez S.A., Peoples, R.W., Vicente, B., Aguayo, L.G. (2018). Effect of cholesterol on membrane fluidity and association of abeta oligomers and subsequent neuronal damage: a double-edged sword. *Front. Aging. Neurosci.* 10, 226. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00226>
- Ferreira, J., Castro, F., Rocha, F., Kuhn, S. (2018). Protein crystallization in a droplet-based microfluidic device: Hydrodynamic analysis and study of the phase behaviour. *Chemical Engineering Science*. 191, 232-244. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.06.066>
- Fiedor, J., Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*. 6, 466-488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>
- Foods Standards Australia New Zealand. (2008). Application A1019 exclusive use of phytoesterol ester in lower-fat cheese products explanatory statement. <https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A1019%20Phytosterol%20esters%20in%20low%20fat%20cheese%20AR%20FINAL>
- Forcada, C.F., Velasco, L., Company, R.S., Martí, A.F. (2015). Association mapping for kernel phytosterol content in almond. *Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00530>
- Fox, P.F. (2003). The major constituents of milk. *Dairy Processing*. 5-41. <https://doi.org/10.1533/9781855737075.1.5>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017). Microbiology of cheese ripening *Fundamentals of Cheese Science*. 333-390. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
- Gagliostro, G.A., Antonacci, L.E., Pérez, C.D., Rossetti, L., Tassone, M., Frossasco, V., Terreno, F., Ugartemendia, A. (2020). Increasing Conjugated Linoleic Acid Content in Milk and Cheese after Supplementing a Blend of Crude Soybean Oil Sediment Combined with Fish Oil to Grazing Dairy Cows. *Open Journal of Animal Sciences*. 10, 468-492. <https://doi.org/10.4236/ojs.2020.103029>
- García-Martínez, C., Fontech, J., Velasco, J., Holgado, F., Marquez-Ruiz, G. (2018). Occurrence of lipid oxidation compounds in commercialized functional dairy products. *International. Dairy Journal*. 86, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.020>
- GBD 2017 Diet Collaborators. (2017). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. 393(10184), 1958-1972. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30041-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30041-8)
- GBD 2019 Diet Collaborators. (2019). Global diet and health: old questions, fresh evidence, and new horizons. 393(10184), 1916-1918. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30500-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30500-8)
- Ghaedi, E., Foshati, S., Ziae, S., Beigrezaei, S., Kord-Varkaneh, H., Ghavami, A., Miraghajani, M. (2020). Effects of phytosterols supplementation on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*. 39(9), 2702-2710. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.12.020>

- Gies, M., Servent, A., Borel, P., Dhuique-Mayer, C. (2020). Phytosterol vehicles used in a functional product modify carotenoid/cholesterol bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*. 68, 103920. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103920>
- Gómez-Cortés, P., Juárez, M., de la Fuente, M.A. (2018). Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. *Trends in Food Science & Technology*. 81, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014>
- Goulding, D. A., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (2020). Milk proteins: An overview. *Milk Proteins*. 21-98. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00002-5>
- Granger, C., Barey, P., Combe, N., Veschambre, P., Cansell, M. (2003). Influence of the fat characteristics on the physicochemical behavior of oil-in-water emulsions based on milk proteinsglycerol esters mixtures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 32(4), 353-363. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.07.003>
- Grilo, E.C. (2014). Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Sci. Technol.* 34(2), 379-385. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000031>
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S., Biesalski, H.K. (2010). β -Carotene Is an important vitamin A source for humans. *The Journal of Nutrition*. 140(12), 2268-2285. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024>
- Guinee, T.P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 99-109. <https://doi.org/10.1111/j.471-0307.2004.00145.x>
- Guinee, T.P., O'Kennedy, B.T., Kelly, P.M. (2007). Effect of Milk Protein Standardization Using Different Methods on the Composition and Yields of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 89, 468-482. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72110-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72110-5)
- Guinee, T.P. (2011). Cheese: Cheese Analogues. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 814-821. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00073-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00073-5)
- Guinee, T.P. (2016). Cheese Analogues. Reference Module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21113-x>
- Gunstone, F.D. (2010). Capítulo 14: Chemical and physical deterioration of bulk oils and shortenings, spreads and frying oils. *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. 413-436. ISBN: 9781845699260
- Halvorsen, B.L. & Blomhoff, R. (2011). Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. *Food & Nutrition Research*. 55(1). <https://doi.org/10.3402/fnr.v55i0.5792>
- Hardy, G. (2000). Nutraceutical and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*. 16, 688-698. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(00\)00332-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00332-4)

- Harte, F.M., Montes, C., Adams, M., San Martin-Gonzalez, M.F. (2007). Solubilized Micellar Calcium Induced Low Methoxyl-Pectin Aggregation During Milk Acidification. *J. Dairy Sci.* 90, 2705-2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-629>
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Perlman, D. (2001). Vitamin E in fortified cow milk uniquely enriches human plasma lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 21-8. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.2.211>
- Héder, M. (2017). From NASA to EU: the evolution of the TRL scale in Public Sector Innovation. *The Innovation Journal: The Public Sector Innovation Journal.* 22(2). https://web.archive.org/web/20171011071816/https://www.innovation.cc/discussion-papers/22_2_3_heder_nasa-to-eu-trl-scale.pdf
- Heggen, E., Granlund, L., Pedersen, J. I., Holme, I., Ceglarek, U., Thiery, J., Kirkhus, B., Tonstad, S. (2010). Plant sterols from rapeseed and tall oils: Effects on lipids, fat-soluble vitamins and plant sterol concentrations. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 20(4), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.04.001>
- Hernández-Alvarez, E., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., Sánchez-Siles, L.M., Granado-Lorencio, F. (2016). In vitro digestion-assisted development of a β -cryptoxanthin-rich functional beverage; in vivo validation using systemic response and faecal content. *Food Chemistry.* 208, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.119>
- Hettinga, K.A. (2019). Chapter 6: Lactose in the dairy production chain. *Lactose Evolutionary Role. Health Effects and Applications.* 231-266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00006-4>
- Hiraoka, Y., Segawa T., Kuwajima, K., Sugai, S., Murai, N. (1980). α -Lactalbumin: A calcium metalloprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 95(3), 1098-1104. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91585-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91585-5)
- Horne, D.S. & Moir, P.D. (1984). Iodination of α_{s1} -casein and its effect on the calcium-induced aggregation reaction of the modified protein. *Int. J. Biol. Macromol.* 6, 316-320. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(84\)90016-3](https://doi.org/10.1016/0141-8130(84)90016-3)
- Horne, D.S., Banks, J.M. (2004). Rennet-induced Coagulation of Milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* 1, 47-70. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80062-9)
- Horne, D.S. (2016). Casein: Micellar Structure (Dual-Binding Model). *Reference Module in Food Sciences.* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00942-2>
- <https://apymel.com.ar/noticias/los-quesos-de-argentina-del-mundo-y-de-francia/>
- <https://goodmanfielder.com/our-products/>
- <https://www.mastellone.com.ar/>
- <https://www.raisio.com/en/investors/>

- <https://upfield.com/>
- <https://www.zeulab.com/producto/residuos-antibioticos-para-el-sector-lacteo/cribado-microbiologico-residuos-antibioticos-para-el-sector-lacteo/eclipse-50/>
- Huppertz, T. (2017). Milk Lipids: Composition, Origin and Properties. Reference Module in Food Science. 1-8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21395-4>
- Ianni, A., Bennato, F., Martino, C., Grotta, L., Martino, G. (2020). Volatile Flavor Compounds in cheese Aspected by Ruminant Diet. *Molecules*. 20(25), 461. <https://doi.org/10.3390/molecules25030461>
- FIL 027:1964. (1964). Determination of the ash content of processed cheese products. Ginebra, Suiza: ISO.
- Iglesias-Figueroa, B.F., Espinoza-Sánchez, E.A., Siqueiros-Cendón, T.S., Rascón-Cruz, Q. (2018). Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International Dairy Journal*. 89, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.004>
- ISO 15885-IDF. <https://www.iso.org/standard/28899.html>
- Iwatani, S., Yamamoto, N. (2019). Functional food products in Japan: A review. *Food Science and Human Wellness*. 8(2), 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.011>
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory, pilot and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*. 63(3), 370-380. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00598.x>
- Jacobsen, C. (2016). Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as food ingredients. *Functional Foods* (Second edition). 401-424. <https://doi.org/10.1533/9780857092557.3.401>
- Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids. *J. Dairy Sci.* 85, 295-350. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74079-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4)
- Jensen, J. L., Mølgaard, A., Navarro Poulsen J.C., Harboe, M.K., Simonsen, J.B., Lorentzen, A.M., Hjernø, K., van den Brink, J.M., Qvist K.B., Larsen, S. (2013). Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 69, 901-913. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003260>
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*. 72, 76-90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>
- Johnson, M. (2002). Cheese pH-What's behind the rise and fall?. *Dairy Pipeline*. 1, 6-9. <https://www.cdr.wisc.edu/pipelines/dairy-pipeline-2002-volume-14-number-4>

- Johnson, M. (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*. 100(12), 9952-9965. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>
- Kantopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *J. Dairy Sci.* 87, 785-796. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1)
- Kalyankar, S.D., Khedkar, C.D., Patil, A.M., Deosarkar, S.S. (2016). Milk: Sources and Composition. *Encyclopedia of Food and Health*. 741-747. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00463-3>
- Kapoor, R. & Metzger, L.E. (2008). Process Cheese: Scientific and Technological Aspects-A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 7, 194-214. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x>
- Karoui, R., Dufour, E., De Baerdemaeker, J. (2007). Front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the oxidation of semi-hard cheeses throughout ripening. *Food Chemistry*. 101, 1305-1314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.028>
- Kasim, N.S., Gunawan, S., Yuliana, M., Ju, Y.H. (2010). A Simple Two-Step Method for Simultaneous Isolation of Tocopherols and Free Phytosterols from Soybean Oil Deodorizer Distillate with High Purity and Recovery. *Sci. Technol.* 45(16), 2437-2446. <https://doi.org/10.1080/01496391003789171>
- Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, J., Ostałowska, A., Zalejska-Fiolka, J., & Birkner, E. (2014). Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 280(1), 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.006>
- Katan, M. B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., & Paoletti, R. (2003). Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceeding*. 78(8), 965-978. <https://doi.org/10.4065/78.8.965>
- Khatab, A.R., Guirguis, H.A., Tawfik, S.M., Farag, M.A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*. 88, 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Kilcawley, K.N., Faulkner, H., Clarke, H.J., O'Sullivan, M.G., Kerry J.P. (2018). Factors influencing the flavour of bovine milk and cheese from grass based versus non-grass based milk production systems. *Foods*. 7(3), 37. <https://doi.org/10.3390/foods7030037>
- Klandar, A.H., Lagaude, A. & Chevalier-Lucia, D. (2007). Assessment of the rennet coagulation of skim milk: A comparison of methods. *International Dairy Journal*. 17(10), 1151-1160. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.03.005>
- Kono, N. & Arai, H. (2015). Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic*. 16(1), 19-34. <https://doi.org/10.1111/tra.12231>

- Korakas, E., Dimitriadis, G., Raptis, A., Lambadiari, V. (2018). Dietary Composition and Cardiovascular Risk: A Mediator or a Bystander?. *Nutrients*. 10(12), 1912. <https://doi.org/10.3390/nu10121912>
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2007). Bioactive peptides from food proteins. *Handbook of Food Products Manufacturing*. 46, 5-21. <https://doi.org/10.1002/0470113553>
- Kristensen, D., Hansen, E., Arndalb, A., Appelgren, Trinderup R., Skibste, L.H. (2001). Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *International Dairy Journal*. 11, 837-843. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00105-4)
- Kuhnt, K., Degen, C., Jaudszus, A., Jahreis, G. (2012). Searching for health beneficial n-3 and n-6 fatty acids in plant seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114(2), 153-160. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100008>
- Kwak, N.S. & Jukes, D.J. (2001). Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*. 13, 99-107. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00028-1)
- Laguna Paredes, C.L., Werteker, M., Rossmann, B., Keplinger, J., Olschewski, I.L., Schreiner, M. (2018). Discrimination of haymilk and conventional milk Via Fatty acid profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12, 1391-1398. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9753-0>
- Lamichhane, P., Kelly, A.L., Sheehan, J.J. (2018). Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *J. Dairy Sci.* 101, 2692-2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>
- Lenssen, K.G.M., Bast, A., de Boer, A. (2018). Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. *J. Funct. Foods*. 47, 386-396. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.047>
- Liaw, I.W., Eshpari, H., Tong, P.S., Drake, M.A. (2010). The impact of antioxidant addition on flavor of cheddar and mozzarella whey and cheddar whey protein concentrate. *J. Food Science*. 75(6), 559-569. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01695.x>
- Lucey J.A., Fox P.F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A Review. *J. Dairy Science*. 76, 1714-1724. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77504-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77504-9)
- Mahmoodani, F., Perera, C.O., Abernethy, G., Fedrizzia, B., Chenb, H. (2018). Lipid oxidation and vitamin D3 degradation in simulated whole milk powder as influenced by processing and storage. *Food Chemistry*. 261, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.043>
- Maniet, G., Jacquet, N., Richel, A. (2019). Recovery of sterols from vegetable oil distillate by enzymatic and non-enzymatic processes. *C. R. Chimie*. 22, 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.01.004>
- Manuelian, C.L., Boselli, C., Vigolo, V., Giangolini, G., De Marchi, M. (2020). Effects of animal versus vegetal rennet on milk coagulation traits in Mediterranean buffalo bulk milk. *Journal of Dairy Science*. 103(6), 4958-4964. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17208>

- Manzocchi, E., Hengartner, W., Kreuzer, M., Giller, K. (2020). Effect of feeding hay vs silages of various types to dairy cows on feed intake, milk composition and coagulation properties. *Journal of Dairy Research*. 1-7. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000801>
- Marino, V.M., Schadt, I., La Terra, S., Manenti, M., Caccamo, M., Licitra, G., Carpino, S. (2012). Influence of season and pasture feeding on the content of α -tocopherol and β -carotene in milk from Holstein, Brown Swiss and Modicana cows in Sicily. *Dairy Sci. & Technol.* 92, 501-513. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0069-2>
- Mark-Herbert, C. (2004). Innovation of a new product category - functional foods. *Technovation*. 24, 713-719. [https://doi.org/10.1016/S0166-4972\(02\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4972(02)00131-1)
- Martino, C., Ianni, A., Grotta, L., Pomilio, F., Martino, G. (2019). Influence of zinc feeding on nutritional quality, oxidative stability and volatile profile of fresh and ripened ewes' milk cheese. *Foods*. 8, 656. <https://doi.org/10.3390/foods8120656>
- Mazloumi, E., Poorolajal, J., Sarrafzadegan, N., Roohafza, H.R., Faradmal, J., Karami, M. (2019). Avoidable Burden of Cardiovascular Diseases in the Eastern Mediterranean Region: Contribution of Selected Risk Factors for Cardiovascular-Related Deaths. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. 26, 227-237. <https://doi.org/10.1007/s40292-019-00319-3>
- McAuliffe, L.N., Kilcawley, K.N., Sheehan, J.J., McSweeney, P.L.H. (2016). Manufacture and incorporation of liposome-entrapped ethylenediaminetetraacetic acid into model miniature Gouda-type cheese and subsequent effect on starter viability, pH, and moisture content. *J. Food Sci.* 81, 2708-2717. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13519>
- McClements, D.J., & Decker, E.A. (2000). Lipid Oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*. 65(8), 1270-1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*. 56, 181-188. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00247-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00247-9)
- Mocking, R.J.T., Assies, J., Lok, A., Ruhe, H.G., Koeter, M.W.J., Visser, I., Bockting, L.H., Schene, A.H. (2012). Statistical Methodological Issues in Handling of Fatty Acid Data: Percentage or Concentration, Imputation and Indices. *Lipids*. 47, 541-547. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3665-2>
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*. 41, 457-500. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00006-1)
- Moreau, R.A., Nyström, L., Whitaker, B.D., Winkler-Moser, J.K., Baere, D.J., Gebauer, S.K., Hicks, K.B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis,

and health-promoting uses. Progress in Lipid Research. 70, 35-61.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.001>

- Moreno-Expósito, L., Illescas-Montes, R., Melguizo-Rodríguez, L., Ruiz, C., Ramos Torrecillas, J., de Luna-Bertos, E. (2018). Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. Life Science. 195, 61-64. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.002>

- Moschopoulou, E. (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. Small Ruminant Research. 101(1-3), 188–195.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.039>

- Moughan, P.J. (2020). Milk proteins: A rich source of bioactives for developing functional foods. Milk Proteins. 633-649. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00017-7>

- Murray, M.T. & Capelli, B. (2020). Beta-Carotene and Other Carotenoids. Textbook of Natural Medicine. 443-450. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-43044-9.00057-1>

- Nagarajappa, N., Battula, S.N., Arora, S., Naik, L.N. (2018). Fortification of milk with phytosterol and its effect on sensory and physicochemical properties. Irish Journal of Agricultural and Food Research. 57, 63-70. <https://doi.org/10.2307/26555012>

- Negri, L.M. (2005). El pH y la acidez de la leche. Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad. 2º ed., INTA. <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>.

- Neuenschwander, M., Ballon, A., Weber, K.S., Norat, T., Aune, D., Schwingshackl, L., Schlesinger, S. (2019). Role of diet in type 2 diabetes incidence: umbrella review of meta-analyses of prospective observational studies. BMJ. 366. <https://doi.org/10.1136/bmj.l2368>

- Ningtyas, D.W., Bhandari, B., Bansal, N., Prakash, S. (2017). Texture and lubrication properties of functional cream cheese: Effect of β-glucan and phytosterol. J. Texture Studies. 1-12. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12282>

- Ningtyas, D.W., Bhandari, B., Bansal, N., Prakash, S. (2019). Flavour profiles of functional reduced-fat cream cheese: Effects of β-glucan, phytosterols, and probiotic *L. rhamnosus*. LWT - Food Science and Technology. 105, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.063>

- Noakes, M., Clifton, P., Ntanios, F., Shrapnel, W., Record, I., McInerney, J. (2002) An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. Am. J. Clin. Nutr. 75(1), 79-86. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.79>

- Normén, L., Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P., Andersson, H. (2007). A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. Journal of Food Composition and Analysis. 20(3-4), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.06.002>

- Nunes, M.A., Costa, A.S.G., Barreira, J.C.M., Vinha, A.F., Alves, R.C., Rocha, A, Oliveira, O.M.P.P. (2016). How functional foods endure throughout the shelf storage? Effects of packing materials and formulation on the quality parameters and bioactivity of smoothies. *LWT - Food Science and Technology*. 65, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.061>
- Nurmi, T., Nyström, L., Edelmann, M., Lampi, A.M., Piironen, V. (2008). Phytosterols in Wheat Genotypes in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *J. Agric. Food Chem.* 56(21), 9710–9715. <https://doi.org/10.1021/jf8010678>
- Nurmi, T., Lampi, A.M., Nyströma, L., Hemery, Y., Rouau, X., Piironen, V. (2012). Distribution and composition of phytosterols and steryl ferulates in wheat grain and bran fractions. *Journal of Cereal Science*. 56(2), 379-38. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.04.010>
- Nyberg, S.T., Batty, G.D., Pentti, J., Virtanen, M., Alfredsson, L., Fransson, E., Goldberg, M., Heikkilä, K., Jokela, M., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Lallukka, T., Leineweber, C., Lindbohm, J.V., Madsen, M.E.H., Magnusson, L.L., Hanson, M.D. Nordin, M., Oksanen, M., Pietiläinen, D., Rahkonen, O., Rugulies, R., Shipley, M.J., Stenholm, S., Suominen, S., Theorell, T., Vahtera, J., Westerholm, P.J.M., Westerlund, H., Zins. M., Hamer, M., Singh-Manoux, D., Bell, J.A., Ferrie, J.E., Kivimäki, M. (2018). Obesity and loss of disease-free years owing to major non-communicable diseases: a multicohort study. *The Lancet Public Health*. 3(10), 490-497. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30139-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30139-7)
- López-Huertas, E. (2010). Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res.* 61(3), 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.10.007>
- O'Callaghan, Y., McCarthy, F.O., O'Brien, N.M. (2014). Recent advances in Phytosterol Oxidation Products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 446, 786-791. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.148>
- O'Mahony, J.A., Fox, P.F. (2013). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. *Advanced Dairy Chemistry*. 43-85. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_2
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2019). Clasificación internacional de enfermedades para estadísticas de mortalidad y morbilidad. Décimo primera revisión (ICD-11). Capítulo 5: Enfermedades endocrinas, nutricionales o metabólicas. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f14940304>
- Panasenko, O.M., Sharov, V.S., Briviba, K., Sies, H. (2000). Interaction of Peroxynitrite with Carotenoids in Human Low Density Lipoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 373(1), 302-305. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1424>
- Panthi, R.R., Kelly, A.L., Sheehan, J.J., Bulbul, K., Vollmer, A.H., McMahon, D.J. (2018). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *J. Dairy Sci.* 102, 177–189. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15039>

- Pastorino, A.J., Hansen, C.L., McMahon, D.J. (2003)a. Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 86, 2751-2760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)7387-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)7387-5)
- Pavlović, J., Greenland, P., Deckers, J.W., Kavousi, M., Hofman, A., Ikram, M.A., Leening, M.J. (2018). Assessing gaps in cholesterol treatment guidelines for primary prevention of cardiovascular disease based on available randomised clinical trial evidence: The Rotterdam Study. *European Journal of Preventive Cardiology.* 25(4), 420-431. <https://doi.org/10.1177/2047487317743352>
- Paximada, P., Howarth, M., Dubey, B.N. (2021). Double emulsions fortified with plant and milk proteins as fat replacers in cheese. *Journal of Food Engineering.* 288, 10229. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110229>
- Pecora, R.P., Dalla Costa, C.A. & Kivatinitz, S.C. (2013). Ecuación para predecir el rendimiento de queso tipo barra. *Tecnología Lactea Latinoamericana.* 79, 46-50. https://www.researchgate.net/publication/278025518_Ecuacion_para_predecir_el_rendimiento_de_queso_tipo_barra
- Persistence Market Research (PRNewsfoto/Persistence Market Research Pvt.). (2020). Global Market Study on Sterols: Accelerating Consumption of Functional Foods Assisting Market Growth. Report code: PMRREP22999
- Piironen, P., Toivo, J., Lampi A.M. (2000). Natural Sources of Dietary Plant Sterols. *Journal of composition and analysis.* 13, 619-624. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0898>
- Plat, J., & Mensink, R.P. (2005). Plant Stanol and Sterol Esters in the Control of Blood Cholesterol Levels: Mechanism and Safety Aspects. *The American Journal of Cardiology.* 96(1), 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.03.015>
- Pokorný, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food: Practical Applications. <https://doi.org/10.1079/BJN2001510>
- Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N., Piva, G. (2012). Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis.* 20, 472-479. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.03.001>
- Prosello, W., Reinheimer, J., Medici, M., Perdigón, G., Vinderola, G., Ghiberto, D. (2003). Bioqueso Ilolay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. [Semanticscholar.org](https://semanticscholar.org) Corpus ID: 80738381.
- Quintana, A.M., Hernandez, J.A., Gonzalez, C.G. (2017). Functional analysis of the zebrafish ortholog of HMGCS1 reveals independent functions for cholesterol and isoprenoids in craniofacial development. *PLoS ONE.* 12(7), 0180856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180856>

- Ramiro-Cortijo, D., Singh, P., Liu, Y., Medina-Morales, E., Yakah, W., Freedman, S.D., Martin, C.R. (2020). Review-Breast Milk Lipids and Fatty Acids in Regulating Neonatal Intestinal Development and Protecting against Intestinal Injury. *Nutrients*. 12(2), 534. <https://doi.org/10.3390/nu12020534>
- Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Official Journal of the European Union (OJ)* L 43, 14.21997, 1-6. Last amended by Regulation (EC) 1829/2003, OJ L 268, 18.10.2003. 1-23. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A31997R0258>
- Reis, F.S., Martins, A., Vasconcelos, M.H., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*. 66, 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.010>
- Ribeiro, D., Sousa, A., Nicola, P., Ferreira de Oliveira, J. M. P., Rufino, A. T., Silva, M., Fernandes, E. (2020). β -Carotene and its physiological metabolites: Effects on oxidative status regulation and genotoxicity in *in vitro* models. *Food and Chemical Toxicology*. 111392. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111392>
- Richoux, R., Aubert, L., Roset, G., Kerjean, J.R. (2009). Impact of the proteolysis due to lactobacilli on the stretchability of Swisstype cheese. *Dairy Sci. Technol.* 89, 31-41. <https://doi.org/10.1051/dst:2008030>.
- Ritota, M. & Manzi, P. (2020). Natural preservatives from plant in cheese making. *Animals*.10, 749. <https://doi.org/10.3390/ani10040749>
- Roche, F.C., Harris-Tryon, T.A. (2021). Illuminating the role of vitamin A in skin innate immunity and the skin microbiome: a narrative review. *Nutrients*. 13, 302. <https://doi.org/10.3390/nu13020302>
- Rossetti, L. (2015). Diferenciación de leche y productos lácteos. Tesis doctoral. Facultad de farmacia y bioquímica. Universidad de Buenos Aires. http://repositoriuba.sisbi.uba.ar/gsdl/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=posgraafa&cl=CL1&d=HWA_1458
- Rudziniska, M., Przybylski, R., Wasowicz, E. (2014). Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines. *Food Chemistry*. 142, 294-298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.041>
- Saeed R. & Naz S. (2019). Effect of heating on the oxidative stability of corn oil and soybean oil. *Grasas y Aceites*. 70(2), 303. <https://doi.org/10.3989/gya.0698181>
- Salo, P., Wester, I., Hopia, A. (2012). Chapter 7: Phytosterols. *Lipids for functional foods and nutraceuticals*. 183-224. <https://doi.org/10.1533/9780857097965.183>
- Sánchez-Crisóstomo, S., Fernández-Martínez, E., Cariño-Cortés, R., Betanzos-Cabrera, G., Bobadilla-Lugo, R. Phytosterols and triterpenoids for prevention and treatment of metabolic-related liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 20(3), 197-214. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190219122357>

- Schaich, K.M. (2008). Co-oxidations of oxidizing lipids: Reactions with proteins, in Lipid Oxidation Pathways. 8(2), 183-274. <https://www.researchgate.net/publication/275336955>
- Schaich, K.M. (2016). Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods. Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats. 1-131. <https://doi.org/10.1016/b978-1-63067-056-6.00001-x>
- Schmidt, C.M., Zürn, T., Thienel, K.J., Hinrichs, J. (2017). Development, optimization and validation of an HPLC-ELSD method for the analysis of enzymatically generated lactulose and saccharide by-products. Food Chemistry. 215, 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.184>
- Secretaría de Agroindustria. (2015). Ficha Nº38. Quesos: Concentración de Nutrientes. Nutrición y Educación Alimentaria.
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_38_Quesos.pdf
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods. 18, Part B, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sharma, B., Iqbal, B., Kumar, S. (2019). Resveratrol-loaded nanoemulsion gel system to ameliorate UV-induced oxidative skin damage: from in vitro to in vivo investigation of antioxidant activity enhancement. Arch. Dermato. Research. 311, 773-793. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01964-3>
- Shilpa, S., Shwetha, H. J., Raju, M., & Lakshminarayana, R. (2020). Factors affecting bioaccessibility and bio-efficacy of carotenoids. Carotenoids: Properties, Processing and Applications. 41-73. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817067-0.00002-6>
- Shima, H., Tanimoto, M. (2016). Effect of milk fat content on the viscoelasticity of mozzarella-type cheese curds. Eur. Food Res. Technol. 242, 157-162. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2525-8>
- Side, C. (2006). Overview on marketing functional foods in Europe. Functional food network general meeting.
<https://scholar.google.com/scholar?q=Side,%20C.%20%20Overview%20on%20marketing%20functional%20foods%20in%20Europe.%20Functional%20food%20network%20general%20meeting>
- Slavin, M., & Yu, L. (2012). A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. Food Chemistry. 135, 2789-2795. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.043>
- Smith, J.R., Vogt, S.J., Seymour, J.D., Carr, A.J., Codd, S.L. (2017). Probing water migration in Mozzarella cheese during maturation and heating utilizing magnetic resonance techniques. Journal of Food Engineering. 198, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.010>
- Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M. (2015). Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. Comprehensive reviews in food science and food safety. 14, 106-122. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12127>

- Soodam, K., Ong, L., Powell, I.B., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2015). Effect of calcium chloride addition and draining pH on the microstructure and texture of full fat Cheddar cheese during ripening. *Food Chem.* 181, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.135>
- Splittstoesser, D. F, & Vanderzant, C. (1992). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington (D.C.). American public health association. ISBN:0875531733
- Statista (2018). <https://www.statista.com/statistics/872144/cheese-production-volume-argentina/>
- Stocker, A. (2004). Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1031, 44-59. <https://doi.org/10.1196/annals.1331.005>
- Sujith Kumar, M.S., Mawlong, I., Singh, D. J. (2017). *Food Process. Eng.* 40(3), 12466. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12466>
- Świątek, S., Komorek, P., Turner, G., & Jachimska, B. (2019). β -Lactoglobulin as a potential carrier for bioactive molecules. *Bioelectrochemistry.* 126, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.12.006>
- Tan, S.S., Tan, C. X. & Tan, S. T. (2020). Cold pressed peanut (*Arachis hypogaea* L.) oil. En: *Cold Pressed Oils: Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality, and Applications.* 32, 357-364. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818188-1.00032-3>
- Teixeira, A.R.S., Santos, J.L.C., Crespo, J.G. (2011). *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 2865-2875. <https://doi.org/10.1021/ie1020766>
- Tetra Pak Processing Systems AB. (1995). Dairy processing handbook. <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/>
- Thionnet, O., Havea, P., Gillies, G., Lad, M., & Golding, M. (2017). Influence of the volume fraction, size and surface coating of hard spheres on the microstructure and rheological properties of model Mozzarella cheese. *Food Biophys.* 12, 33-44. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-9460-5>
- Traber, M.G., Leonard, S.W., Ebenuwa, I., Violet, P.C., Wang, U., Niyyati, M., Padayatty, S., Tu, H., Courville, A., Bernstein, S., Choi, J., Shamburek, R., Smith, S., Head, B., Bobe, G., Ramakrishnan, R., Levine, M. (2019). Vitamin E absorption and kinetics in healthy women, as modulated by food and by fat, studied using 2 deuterium-labeled α -tocopherols in a 3-phase crossover design. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 110(5), 1148-1167. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz172>
- Traber, M.G., & Bruno, R.S. (2020). Vitamin E. *Present Knowledge in Nutrition.* 115-136. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00007>
- Trevithick-Sutton, C.C., Foote, C.S., Collins, M., Trevithicket, J.R. (2006). The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: a chemiluminescence and ESR study. *Mol. Vis.* 12, 1127-1135. PMID: 17093397

- Trmčić, A., Ralyea, R., Meunier-Goddik, L., Donnelly, C., Glass, K., D'Amico, D., Meredith, E., Kehler, M., Tranchina, N., McCue, C., Wiedmann, M. (2017). Consensus categorization of cheese based on water activity and pH. A rational approach to systemizing cheese diversity. *Journal of Dairy Science*. 100(1), 841-847. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11621>
- Universidad Nacional del Litoral (UNL). (2004). Logran producir un queso único en el mundo. https://www.unl.edu.ar/noticias/news/view/logran_producir_un_bioqueso_%C3%BAxico_en_el_mundo#.YAAoP9hKjIU
- Ullah, R., Khan, S., Ali, H., Bilal, M., Saleem, M. (2017). Identification of cow and buffalo milk based on Beta carotene and vitamin-A concentration using fluorescence spectroscopy. *PLoS ONE*. 12(5), 0178055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178055>
- Urashima, T., Asakuma, S., Messer, M. (2007). Milk oligosaccharides. In: Kamerling, J.P., Boons, G. J., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N., Voragen, A.G.J. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*. 4, 695-724. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00128-8>
- Waite, L.H., Phan, Y.L., & Spinler, S.A. (2017). Translating guidelines into practice: Interpreting the 2016 ACC expert consensus decision pathway on the role of nonstatin therapies for LDL-cholesterol lowering in the management of atherosclerotic cardiovascular disease risk. *Annals of Pharmacotherapy*. 51(10), 914-920. <https://doi.org/10.1177/1060028017714003>
- Wang, L.J., & Song, B.L. (2012). Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821(7), 964-972. <https://doi.org/10.1016/j.bbapli.2012.03.004>
- Wang, Y.J., Bian, Y., Luo, J., Lu, M., Xiong, Y., Guo, S.Y., Chang, T.Y. (2018). Cholesterol and fatty acids regulate cysteine ubiquitylation of ACAT2 through competitive oxidation. *Nature Cell Biology*. 19(7), 808. <https://doi.org/10.1038/ncb3551>
- World Cheese Market Report 2000-2020. <http://www.pmfodk.dk/upl/9735/WCMINFORMATION.pdf>
- Xie, J. (2015). Evidence for Multiple Oxidation Pathways from Non-volatile Products of Methyl Linoleate. *Food Science, Rutgers The State University of New Jersey*. 05. <https://doi.org/doi:10.7282/T3959KDF>
- Yan, F., Yang, H., Li, J., Wang, H. (2012). Optimization of phytosterols recovery from soybean oil deodorizer distillate. *Am. J. Oil Chem. Soc.* 89, 1363-1370. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2023-0>
- Yang, K. & Trewin, J. (2004). *Multivariate statistical methods in quality management*. McGraw-Hill. ISBN: 9780071432085. <https://www.accessengineeringlibrary.com/content/book/9780071432085>
- Yang, S.W., Watkinson, P., Gillies, G., James, B.J. (2016). Microstructural transformations in anisotropy and melt-stretch properties of low moisture part skim mozzarella cheese. *International Dairy Journal*. 62, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.013>

- Yehye, W.A., Abdul Rahman, N., Alhadi, A., Khaledi, H., Ng, S.W., Ariffin, A. (2012). Butylated Hydroxytoluene Analogs: Synthesis and Evaluation of Their Multipotent Antioxidant Activities. *Molecules*. 17, 7645-7665. <https://doi.org/10.3390/molecules17077645>
- Yuang, L., Zhang, F., Jia, S., Xie, J., Shen, M. (2020). Differences between phytosterols with different structures in regulating cholesterol synthesis, transport and metabolism in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*. 65, 103715. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103715>
- Zhang, Y., Holman, B.W.B., Ponnampalam, E.N., Kerr, M.G., Bailes, K.L., Kilgannon, A.K., Hopkins, D.L. (2018). Understanding beef flavour and overall liking traits using two different methods for determination of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). *Meat Science*. 149, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.018>

8. ANEXOS

8.1. Ficha técnica de fitoesteroles libres Advasterol 90 ® (FEL)

PLANT STEROLS

ADVASTEROL 90

Product Data Sheet



DESCRIPTION

ADVASTEROL 90 is an off-white powder having a slight characteristic vegetable oil aroma. Obtained from vegetable oils ADVASTEROL 90 is rich in Beta-Sitosterol, Stigmasterol and Campesterol, with small amounts of other sterols.

INGREDIENTS

Natural phytosterols

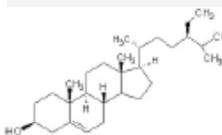
ASSAY

ADVASTEROL 90 contains not less than 900 mg/g of total phytosterols.

CHEMICAL COMPOSITION (Typical Values)

β - Sitosterol (%)	34 - 50
Campesterol (%)	17 - 30
Stigmasterol (%)	22 - 30
Brassicasterol (%)	0 - 3
Sitostanol (%)	0 - 1
Other Sterols (%)	2 - 3

Slight variations of typical composition due to variability of vegetable oil feedstocks can occur.



β - Sitosterol
C₂₉H₄₈O
Molecular Weight 414.71



Campesterol
C₂₈H₄₆O
Molecular Weight 400.68



Stigmasterol
C₂₈H₄₆O
Molecular Weight 412.69

PRODUCT SPECIFICATIONS

Quality Control Data (Measured on each Lot)

Total Plant Sterols (%)	Min. 90
-------------------------	---------

Additional Technical Data (Determined Regularly)

Melting Point (°C)	135-145
Molecular Weight	400.68 - 414.72
Specific Gravity (25°C)	0.3- 0.5

Contaminants

Organic Volatile Impurities	Pass USP 32, Method IV
Heavy Metals as Pb (mg/Kg)	Max. 10
Arsenic (mg/Kg)	Max. 0.2
Lead (mg/Kg)	Max. 0.1
Mercury (mg/Kg)	Max. 0.1
Cadmium (mg/Kg)	Max. 0.2
Pesticide Residues (ppm)	Max. 2.0
Sulphated Ash (%)	Max. 0.1

Microbiology

Total plate count (CFU/g)	Max. 100
Yeast (CFU/g)	Max. 25
Moulds (CFU/g)	Max. 25
Coliforms (CFU/G)	Max. 10
Salmonella (/10g)	Negative
Escherichia coli (/10g)	Negative
Staphylococcus aureus (/10g)	Negative
Mycotoxins (Aflatoxin B1)	Negative

PLANT STEROLS

ADVASTEROL 90

Product Data Sheet

STANDARDS

Produced according GMP, Codex Alimentarius. Certified Kosher.

The U.S. FDA has recognized Plant Sterols as safe (GRAS) GRN #398 Vegetable oil and Tall Oil derived phytosterols and phytosterols ester formulations; and are GRAS exempt for the requirement for pre-market approval (21 CFR, Part 170.36) for certain food categories.

ADVASTEROL 90 is TSE & BSE free; does not contain any meat products, nor alcohol, and has not been irradiated.

According to Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (EFSA, May 2007) it is unlikely that natural phytosterols from soybean sources will trigger a severe allergic reaction in susceptible individuals.

The FDA will allow following claim for products containing plant sterols: "Foods containing at least 0.4 g per serving of plant sterols, eaten twice a day with meals for a daily total intake of at least 0.8 g, as part of a diet low in saturated fat and cholesterol, may reduce the risk of heart disease."

SOLUBILITY

Insoluble in water, oil and fats.

STORAGE CONDITIONS

ADVASTEROL 90 must be stored in sealed containers, at room temperature and dry conditions, given that product is unstable when exposed to light, oxygen, alkaline environment or high temperatures.

SHELF LIFE

48 Months from manufacturing date from in unopened package.

PACKAGING

ADVASTEROL 90 is available in 25Kg containers or 400 Kg Big Bags.

DISCLAIMER

This Product Data Sheet contains information based on our laboratory analysis. Advanced Organic Materials S.A. assumes no responsibility with regards to the suitability of the products for any specific purposes intended by the user. Recommendations for use and application of the product are given for information purposes. These suggestions do not release customers for conducting the necessary tests as suitability of the product is dependent on the characteristics of the intended process. The user of the product is solely responsible for compliance with all laws and regulations applied to the use of the product, including intellectual property rights of third parties.

The information represent typical values, analytical methods are available at customers request.

NUTRITIONAL INFORMATION

Calories (kcal/100g)	2
Total Carbohydrate (%)	0
Protein (%)	0
Total fat (%)	0.2
Dietary Fiber (%)	0
Humidity (%)	1.8
Ashes (%)	0
<u>Fatty Acids</u>	
Saturated (%)	0
Monounsaturated (%)	0.1
Polyunsaturated (%)	0.1
Trans Fat (%)	0
Sodium (mg/100g)	0.7
Potassium (mg/100g)	0.8
Calcium (mg/100g)	0
Lead (mg/100g)	0
Sugars	0
Starch	0
Cholesterol (mg/100g)	0
Vitamin A	0
Vitamin C	0
Vitamin E (IU)	0
Other, Phytosterols (%)	Min. 90

APPLICATIONS

ADVASTEROL 90 can be used in a wide variety of food preparations as an LDL Cholesterol reducer. It can also be used in cosmetics for its emulsifying and stabilizing properties.

Suggested manner of use is identical and as specified in following EC decisions: 2004/333, 2004/334, 2004/335, 2004/336, 2004/845, 2006/58 & 2008/36.

8.2. Ficha técnica de fitoesteroles libres Advasterol Ester ® (FEE)

PLANT STEROLS

ADVASTEROL ESTER

Product Data Sheet



DESCRIPTION

ADVASTEROL ESTER is a light yellow and viscous paste, having a slight characteristic vegetable oil aroma. Obtained by esterification of free plant sterols (Soybean DOD) with fatty acids from vegetable oil (Rapeseed). ADVASTEROL ESTER is a concentrated form of phytosterols esters, mainly Beta-Sitosterol, Stigmasterol and Campesterol.

INGREDIENTS

Natural phytosterols esters
Natural phytosterols

ASSAY

ADVASTEROL ESTER contains not less than 970 mg/g of total sterol esters and free phytosterols.

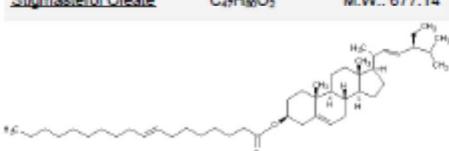
CHEMICAL COMPOSITION (Typical Values)

Total Sterol Ester content + Free Sterols (%)	97 - 99
Free Sterols (%)	0.5 - 3.0
β - Sitosterol (%)*	37 - 53
Campesterol (%)*	17 - 31
Stigmasterol (%)*	21 - 35
Other Sterols (%)*	3 - 9

Slight variations of typical composition due to variability of vegetable oil feedstocks can occur.



β - Sitosterol Oleate C₂₆H₄₂O₂ M.W.: 679.15
Stigmasterol Oleate C₂₇H₄₄O₂ M.W.: 677.14



*: Relative composition of the sterol fraction

PRODUCT SPECIFICATIONS

Quality Control Data (Measured on each Lot)

Total Sterol Ester content + Free Sterols (%)	Min. 97.0
Free Sterols (%)	Max. 3.0
Acid Value (mg KOH/g)	Max. 1.0

Additional Technical Data (Determined Regularly)

Viscosity @30°C (cP)	2400-2700
Molecular Weight	665.05-681.14
Specific Gravity (25°C)	0.91- 0.98

Contaminants

Organic Volatile Impurities	Pass USP 32, Method IV
Heavy Metals as Pb (mg/Kg)	Max. 10
Arsenic (mg/Kg)	Max. 0.2
Lead (mg/Kg)	Max. 0.1
Mercury (mg/Kg)	Max. 0.1
Cadmium (mg/Kg)	Max. 0.2
Pesticide Residues (ppm)	Max. 2.0
Sulphated Ash (%)	Max. 0.1

Microbiology

Total plate count (CFU/g)	Max. 100
Yeast (CFU/g)	Max. 25
Moulds (CFU/g)	Max. 25
Coliforms (CFU/G)	Max. 10
Salmonella (/10g)	Negative
Escherichia coli (/10g)	Negative
Staphylococcus aureus (/10g)	Negative
Mycotoxins (Aflatoxin B1)	Negative



PLANT STEROLS

ADVASTEROL ESTER

Product Data Sheet

STANDARDS

Produced according GMP, Codex Alimentarius. Certified Kosher.

The U.S. FDA has recognized Plant Sterols Esters as safe (GRAS) GRN #398 Vegetable oil and Tallow derived phytosterols and phytosterols ester formulations; and are GRAS exempt for the requirement for pre-market approval (21 CFR, Part 170.36) for certain food categories.

ADVASTEROL ESTER is TSE & BSE free; does not contain any meat products, nor alcohol, and has not been irradiated.

According to Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (EFSA, May 2007) it is unlikely that natural phytosterols from soybean sources will trigger a severe allergic reaction in susceptible individuals.

The FDA will allow following claim for products containing plant sterol esters: "Foods containing at least 0.65 g per serving of plant sterol esters, eaten twice with meals for a daily intake of at least 1.3 g, as part of a diet low in saturated fat and cholesterol, may reduce the risk of heart disease."

SOLUBILITY

Insoluble in water. Soluble in oil, fats, hexane, Iso-octane and 2-propanol.

STORAGE CONDITIONS

ADVASTEROL ESTER must be stored in sealed containers, at room temperature and dry conditions, given that product is unstable when exposed to light, oxygen, alkaline environment or high temperatures.

SHELF LIFE

18 Months from manufacturing date from unopened package.

PACKAGING

ADVASTEROL ESTER is available in 18Kg metal pails or 190 Kg metal drums.

DISCLAIMER

This Product Data Sheet contains information based on our laboratory analysis. Advanced Organic Materials S.A. assumes no responsibility with regards to the suitability of the products for any specific purposes intended by the user. Recommendations for use and application of the product are given for information purposes. These suggestions do not release customers for conducting the necessary tests as suitability of the product is dependent on the characteristics of the intended process. The user of the product is solely responsible for compliance with all laws and regulations applied to the use of the product, including intellectual property rights of third parties.

The information represent typical values, analytical methods are available at customers request.

NUTRITIONAL INFORMATION

Calories (kcal/100g)	340
Total Carbohydrate (%)	0
Protein (%)	0
Total fat (%)	37.8
Dietary Fiber (%)	0
Humidity (%)	1.8
Ashes (%)	0
<u>Fatty Acids</u>	
Saturated (%)	4.2
Monounsaturated (%)	22.3
Polyunsaturated (%)	11.3
Trans Fat (%)	0
Sodium (mg/100g)	0.7
Potassium (mg/100g)	0.8
Calcium (mg/100g)	0
Lead (mg/100g)	0
Sugars	0
Starch	0
Cholesterol (mg/100g)	0
Vitamin A	0
Vitamin C	0
Vitamin E (IU)	0
Other, Phytosterols (%)	Min. 90

APPLICATIONS

ADVASTEROL ESTER can be used in a wide variety of food preparations as an LDL Cholesterol reducer. It can also be used in cosmetics for its emulsifying and stabilizing properties.

Suggested manner of use is identical and as specified in following EC decisions: 2004/333, 2004/334, 2004/335, 2004/336, 2004/845, 2006/58 & 2006/36.

8.3. Ficha técnica de fitoesteroles emulsificados EMULFIT AE 3675 ® (FEEM)

8.4. Anexo IV. Ficha técnica Vitamina E natural SF 900 UI ®

Ficha Técnica

VITAMINA E NATURAL

VITAMINA E NATURAL SF 900 IU

Hoja Técnica de Producto



DESCRIPCIÓN

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI es un aceite viscoso de Color ámbar a rojo con aroma y sabor suave, olor característico del aceite vegetal. Contiene d-alfa tocoferol obtenido del aceite de girasol.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Datos de control de Calidad (Determinados en cada lote)

Unidades Internacionales (UI)	Min. 900
d- α -tocoferol (%)	Min. 60.4
Acidez (ml 0.1N NaOH/g)	Max. 1.0

Información Técnica Adicional (Determinada regularmente)

Tocoferoles Totales (%)	66 - 69
Rotación Específica	Min. +24
Densidad Relativa (20/20°C)	0.92 - 0.96
Color Gardner	Max. 12

Contaminantes

Impurezas Orgánicas Volátiles Pasa USP 32, Método IV	
Metales Pesados como Pb (mg/Kg)	Max. 10
Arsénico (mg/Kg)	Max. 0.2
Plomo (mg/Kg)	Max. 0.1
Mercurio (mg/Kg)	Max. 0.1
Cadmio (mg/Kg)	Max. 0.2
Residuos de Pesticidas (ppm)	Max. 2.0
Cenizas Sulfatadas (%)	Max. 0.1

Microbiológico

Recuento de aerobios totales (CFU/g)	Max. 100
Levaduras (CFU/g)	Max. 25
Hongos (CFU/g)	Max. 25
Coliformes (CFU/G)	Max. 40
Salmonella (/10g)	Ausente
Escherichia coli (/10g)	Ausente
Staphylococcus aureus (/10g)	Ausente
Micotoxinas (Aflatoxina B1)	Ausente

INGREDIENTES

Tocoferoles Naturales de Aceite de Girasol
Aceite de Girasol

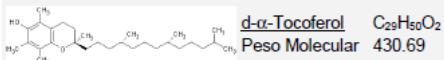
ENSAYOS

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI contiene no menos de 604 mg/g de d- α -tocoferol que representa 900 Unidades Internacionales (UI). Contenido de tocoferoles totales de 66-69%.

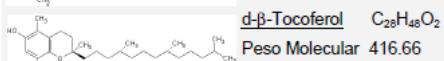
COMPOSICIÓN QUÍMICA

d- α -Tocoferol (%)	Min. 60.4
d- β - γ -Tocoferol (%)	3.0 - 7.0
d- δ -Tocoferol (%)	0.6 - 3.0

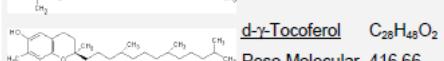
Pueden producirse leves variaciones de composición típica debido a la variabilidad de las materias primas.



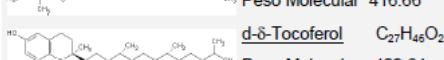
d- α -Tocoferol C₂₉H₅₀O₂
Peso Molecular 430.69



d- β -Tocoferol C₂₈H₄₈O₂
Peso Molecular 416.66



d- γ -Tocoferol C₂₈H₄₈O₂
Peso Molecular 416.66



d- δ -Tocoferol C₂₇H₄₆O₂
Peso Molecular 402.64

VITAMINA E NATURAL

VITAMINA E NATURAL SF 900 IU

Hoja Técnica de Producto

STANDARDS

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI cumple con los requisitos de la monografía del actual Formulario Nacional (NF, Tocoferol Excipiente) y FCC (RRR-Tocoferoles, concentrado, mezcla, bajo alfa); como los de la Union Europea (E 306, extracto rico en tocoferoles).

Producido acorde a GMP, Codex Alimentarius. Certificado Kosher.

La U.S. FDA ha reconocido a los tocoferoles como sanos (GRAS) como nutriente y como conservante (21 CFR, Parte 182.8890 & 182.3890); y son GRAS exentos de autorización previa a la comercialización (21 CFR, Parte 170.36) para ciertas categorías de comida.

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI se encuentra libre de TSE & BSE; no contiene productos cárnicos, ni alcohol, y no ha sido irradiado.

SOLUBILIDAD

Soluble en aceites y grasas. Insoluble en agua. Parcialmente soluble en etanol, miscible con solventes orgánicos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI se debe almacenar en envases sellados, ya que el producto es sensible a la exposición con aire, luz o altas temperaturas.

VIDA ÚTIL

36 meses desde la fecha de manufactura.

PACKAGING

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI está disponible en baldes metálicos de 18 Kg y tambores metálicos de 190 Kg.

DISCLAIMER

Esta hoja técnica contiene información basada en nuestros análisis de laboratorio. Advanced Organic Materials SA no asume ninguna responsabilidad en relación a la aplicación particular de estos productos por parte del usuario final. Recomendaciones sobre la utilización del producto son a título informativo. Dichas recomendaciones no eximen al cliente de llevar a cabo las pruebas necesarias ya que la aplicabilidad del producto depende de las características de cada proceso. El usuario de estos productos es el responsable de cumplir con las leyes y regulaciones vigentes, incluyendo derechos de propiedad intelectual.

La información proporcionada representa valores típicos, los métodos se encuentran a disposición del cliente.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

Calorías (kcal/100g)	81
Carbohidratos Totales (%)	0
Proteínas (%)	0
Grasas Totales (%)	9
Fibra Dietaria (%)	0
Humedad (%)	0.2
Cenizas (%)	0
<u>Acidos Grasos</u>	
Saturados (%)	1.2
Monoinsaturados (%)	1.8
Poliiinsaturados (%)	2.0
Grasas Trans (%)	<0.1
Sodio (mg/100g)	0.7
Potasio (mg/100g)	<0.5
Calcio (mg/100g)	0
Plomo (mg/100g)	0
Azúcares	0
Almidón	0
Colesterol (mg/100g)	0
Vitamina A	0
Vitamina C	0
Vitamina E (IU/100g)	Min. 90000
Otros, Tocoferoles (%)	66-69
Otros, No tocoferoles (%)	22-25

APLICACIONES

VITAMINA E NATURAL SF 900 UI es utilizado como nutriente esencial y suplemento dietario en cápsulas de gel y en las preparaciones alimenticias. El producto es completamente soluble en grasas y aceites.

Los Productos que contienen VITAMINA E NATURAL SF 900 UI pueden rotularse como Natural Source Vitamin E.

8.5. Anexo V. Protocolo elaboración de blando bajo en grasa con fitoesteroles EEA-INTA Rafaela



1.- Objetivo

Elaborar queso blando utilizando diferentes fermentos directos y coagulantes utilizando una tecnología que permita obtener quesos de calidad, rendimiento y características sensoriales uniformes.

2.- Alcance/ Responsable

Este procedimiento puede ser utilizado para dar respuesta a todos los ensayos de Investigación y Desarrollo, que involucren la elaboración de este tipo de queso y que precisen contar con una tecnología constante a fin de cuantificar el efecto de ciertas variables sobre el producto final.

3.- Documentación de referencia

4.- Principio

5.- Equipos y materiales

5.1 **Leche:** Se utiliza leche fresca de buena calidad higiénico - sanitaria (pH: 6.6-6.7, acidez: 14-16°D, RBT $\leq 10^6$ ucf/ml y RCS: 400.000 ccf/ml).

5.2 **Cuajo:** El volumen a agregar es de 9 ml cada 100 litros de leche. El mismo se disuelve en aproximadamente 200 ml de agua destilada, inmediatamente antes de agregar el cuajo a la tina.

5.3 **Fermento:** Se utiliza los siguientes fermentos: El maestro quesero. Cada sobre de fermento se almacena a -20°C . Para cada elaboración se utiliza un sobre de fermento. Se disuelve el fermento en 100 ml de leche pasteurizada (la misma de la elaboración, a aproximadamente 36°C), 5 minutos antes de adicionarlo a la tina de elaboración.

5.4 **Cloruro de calcio:** se agrega en solución al 40%. La cantidad a adicionar es de 25 ml en 100 litros de leche.

5.5 **Tanque de almacenamiento de la leche:** la leche previa a la elaboración, debe mantenerse a 4°C . El tiempo de almacenamiento de la leche no debe exceder las 48 horas desde el momento del ordeño.

5.6 **Filtro de linea de entrada de la leche**

5.7 **Precalentador a placas**

5.8 **Desnatadora**

5.9 **Tina quesera:** para dar respuesta al objetivo de obtener tecnologías constantes y repetibles, es necesario que la misma permita: regular de forma automática la velocidad de giro de las liras, monitorear cantidad de leche en la tina y la temperatura de la leche en la tina.

5.10 **Pre-prensa**

5.11 **Mesa de trabajo**

5.12 **Moldes:** se utilizan moldes cilíndricos perforados, de plástico, que permitan obtener quesos de 3 a 4kg.

5.13 **Salmuera:** la concentración de la salmuera debe estar entre $20 \pm 0.5^{\circ}\text{B}$. Se le adiciona además de NaCl, Cl₄Ca, al 0.6 %. La salmuera debe estar a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$

5.14 **Cámara de maduración:** temperatura: 4 ± 2

5.15 **Coagulómetro**

5.16 **pHímetro y electrodo de pH**

5.17 **Acidímetro**

5.18 **Baño maría**

5.19 **Equipo para determinar la concentración de grasa y proteína de la leche**

1. Tomar muestra de leche de tanque. Termizar a 40 °C y medir la concentración de grasa y proteína de la misma.
2. Utilizando el diagrama de Pearson, calcular el volumen de leche a desnatar, de tal modo de obtener una valor de grasa final en la leche estandarizada de 1.9%.
3. Desnatar los kg de leche calculados en 1 (para pasar de litros a kg, multiplicar el volumen de leche por la densidad de la leche: 1,03).
4. Completar el volumen de leche necesario adicionando leche de tanque.
5. Pasteurizar la leche: 63°C 30 min.
6. Enfriar. Cuando la temperatura llegue a 55°C adicionar el cloruro de calcio.
7. Agregar el fermento directo a la fina, disolviéndolo previamente en una porción de leche pasteurizada (de la fina) a 40-41 °C. Agitar durante 15 min.
*Temperatura de agregado del fermento: 37°C
8. Adición de coagulante: 1 sobre de fermento directo. Utilizar una de las mismas para diluir en leche pasteurizada y adicionar a fina.
9. Adición de coagulante: 20 min luego de haber adionado el fermento.
*Temperatura de coagulación: 38-37°C
*Dosis de coagulante: 8ml cada 100 lts de leche.
10. Un minuto luego de agregar el coagulante, se detiene la agitación y se introduce el coagulómetro. Luego se da inicio al programa presionando la tecla renneting. Factor de corte 3.
Nota 1: no debe pasar más de 2 min entre la adición del coagulante y el inicio del programa.
Nota 2: antes de comenzar a cortar la cuajada detener el programa del coagulómetro presionando la tecla stop y quitarlo de la fina.
11. El corte de la cuajada debe realizarse cuando el códiglo esté bien firme.
12. Corte: 2 vueltas a 4,8 rpm.
13. Corte: 3 vueltas a 8 rpm.
14. Agitación: 3 vueltas a 10 rpm.
15. Corte: 2 vueltas a 16 rpm.
16. Corte: 3 min a 10 rpm.
17. Calentar a 39-40°C durante 2 min. El mismo se realiza cortando la masa a 16 rpm.
18. Bajar de la masa a los moldes con manguera sanitaria.
19. Incubar los quesos a 38 °C durante la acidificación. Medir pH y temperatura en una sola forma cada media hora hasta llegar a pH 5,2. Voltear los quesos durante la acidificación en otro molde no más de 3 veces.
Nota 3: en condiciones ideales, desde que se agrega el fermento hasta que llegue a pH deben transcurrir 3,5 a 4 horas.
20. Colocar en salmuera (20%Br, 4°C y pH 5,00). Tiempo de salado: 10 min por kilogramo de queso en salmuera con agitación y recirculación. En salmuera sin agitación y sin recirculación 15 min por kg de queso.
21. Oreo: 24 hs. En moldes tapados para que no se sequen.
22. Pesar los quesos para obtener el rendimiento de la elaboración.
23. Rendimiento: (Kg. de queso/ kg leche) *100
24. Envasar al vacío y almacenar en cámara de 4°C hasta el final de la maduración.
25. Primer muestreo: Tiempo 0 antes de envasar al vacío. Análisis: humedad.
26. Segundo muestreo: final de la maduración (20 días).
Análisis: Físico químico (Ph, Cloruros, grasa, Humedad y proteína) y microbiológico (coliformes a 30°C y a 45°C, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp).