



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTA DE QUÍMICA

**QUESO COTIJA: ESTUDIO DEL
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO, PROXIMAL
Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

VERÓNICA HERNÁNDEZ BRIONES



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO



PRESIDENTE: Francisca Aida Iturbide Chiñas
VOCAL: Hermilo Leal Lara
SECRETARIO: Maricarmen Quirasco Baruch
1ER. SUPLENTE: Arturo Navarro Ocaña
2DO. SUPLENTE: Amelia Ma. de Gpe. Farrés González Saravia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

L-312 y L-321. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E.
Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México

Este trabajo de investigación recibió apoyo del proyecto PAPIIT IN200705 “Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos”.

ASESOR

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUSTENTANTE

Verónica Hernández Briones

AGRADECIMIENTOS

- ★ A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar, por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios y por brindarme las herramientas necesarias para desempeñar adecuadamente mi vida profesional.
- ★ A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría, por sus sabios consejos, su gran apoyo y su infinita confianza durante la elaboración de este proyecto. Gracias por ser una excelente asesora pero sobre todo por ser una gran amiga con la que he podido culminar el primero de muchos éxitos.
- ★ A la M. en C. Francisca Aida Iturbe Chiñas y al Dr. Hermilo Leal Lara por formar parte de este jurado, así como por el tiempo y la dedicación que invirtieron en la revisión de este trabajo. Gracias por sus acertados comentarios y valiosas sugerencias para el mejoramiento de este escrito.
- ★ Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por apoyarme desde los inicios de este proyecto y por compartir conmigo sus conocimientos. Gracias por todos sus consejos, su confianza y su valiosa amistad.
- ★ A la Dra. Amelia Farrés González Saravia por creer siempre en mí, por sus valiosos consejos y por todo el conocimiento transmitido. Gracias por su gran apoyo, en todos los ámbitos, durante todo este tiempo.
- ★ A la M. en C. Sandra Pérez M., por haberme asesorado en la metodología de la determinación de cloruros.

DEDICATORIAS

- ★ A mis padres Ma. Antonia Briones Amador y Cástulo Hernández Fabían porque les debo la vida, porque que han sido mi mejor ejemplo y por la profunda admiración que siento por ambos. A ellos por todas sus enseñanzas, por todo su amor y porque me han dado todo y mucho más, por lo que nunca podría pagarles lo que han hecho por mí.
- ★ A ti mamá por ser la mejor mujer y madre del mundo, porque siempre has estado en todo momento a mi lado, porque siempre me has apoyado y lidiado sin importar la situación. A ti que te has dedicado en cuerpo y alma a nosotros y porque no existe otro ser como tú. TE AMO MAMÁ.
- ★ A ti papá porque eres especial, porque siempre has creído en mí, me has apoyado y me has aguantado en todo momento. A ti que siempre buscas lo mejor para mi y tu familia sin importar el trabajo que eso implique, porque eres único y eres mi padre. TE AMO PAPÁ
- ★ A ti Juan Carlos Galicia Jiménez, porque eres el amor de mi vida, porque has compartido conmigo todos mis triunfos y mis fracasos, porque me has apoyado, comprendido, guiado y amado durante todos estos años, porque eres la pieza clave de todos mis logros y la fuerza para levantarme en mis todas mis caídas, porque me has enseñado tanto y lo que no se aprende en un aula. A ti Carlos que no tengo palabras suficientes para expresar mi agradecimiento por todo lo que me has dado y por lo feliz que me has hecho. Amor ¡LO LOGRAMOS! el primero de muchos éxitos que nos esperan durante toda una vida. Gracias por todo, gracias por existir. TE AMO.
- ★ A ti Paty por ser mi hermana y por todas risas y lágrimas que hemos compartido. A ti porque me has escuchado y apoyado en diversas ocasiones y porque estoy muy orgullosa de ti. TE QUIERO MUCHO.
- ★ A todos mi familiares por todo el apoyo que he recibido durante toda mi vida, porque de alguna manera me han brindado su ayuda, su amistad y su cariño, por lo que siempre los llevo en mi corazón. LOS QUIERO MUCHO.
- ★ A todos mis grandes amigos que han estado conmigo a lo largo de mi vida, porque me han apoyado siempre y cuando más los he necesitado, por todos los momentos de alegría o de tristeza que hemos compartido y porque me han aguantado durante todo este tiempo. A ustedes, que son parte de este logro y que no es necesario mencionarlos uno por uno para que sepan lo importantes que son para mí y lo agradecida que estoy por contar con su amistad. Gracias por todo su apoyo y su cariño. LOS QUIERO MUCHO y recuerden que siempre pueden contar con mi amistad.

ÍNDICE

página

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE GRÀFICAS

INDICE DE TABLAS

RESUMEN

I

INTRODUCCIÓN

III

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. QUESO

1.1.1. Definición

1

1.1.2. Clasificación

1

1.1.3. Importancia

2

1.1.4. Calidad

2

1.1.4.1 Factores que afectan la calidad del queso

4

1.1.5. Producción

6

1.2. QUESO COTIJA

1.2.1. Queso Cotija Región de Origen

7

1.2.2. Características generales

9

1.2.3. Composición química

9

1.2.4. Proceso de elaboración

10

1.2.5. Producción

13

1.3. ALIMENTOS FUNCIONALES

1.3.1. Generalidades

14

1.3.2. Definición

14

1.3.3. Clasificación

15

1.3.3.1. Compuestos fenólicos

1.3.3.1.1. Definición

15

1.3.3.1.2. Clasificación

15

1.3.3.1.3. Características generales

18

1.3.3.1.4. Absorción y metabolismo

18

1.3.3.1.5. Importancia

19

1.3.3.1.6. Antioxidantes

20

1.3.3.1.7. Actividad antioxidante

23

1.3.3.1.7.1. Métodos de evaluación

23

	página
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS	27
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	
3.1. OBJETIVOS GENERALES	28
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	28
CAPÍTULO 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. DATOS DE LA MUESTRA	31
5.2. TOMA DE MUESTRA	32
5.3. ANÁLISIS PROXIMAL	
5.3.1. Determinación humedad y sólidos totales	32
5.3.2. Determinación de cenizas totales	33
5.3.3. Determinación de grasa butírica	33
5.3.4. Determinación de proteína total	34
5.3.5. Determinación de carbohidratos totales	35
5.4. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS	
5.4.1. Determinación de pH	35
5.4.2. Determinación de acidez	35
5.4.3. Determinación de cloruros	36
5.4.4. Determinación de la actividad acuosa	36
5.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
5.5.1. Extracción de polifenoles	37
5.5.2. Determinación de polifenoles totales	37
5.5.3. Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante	38
5.5.4. Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante	
5.5.4.1. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH	38
5.5.4.2. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS	39
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1. ANÁLISIS PROXIMAL	
6.1.1. Determinación humedad y sólidos totales	40
6.1.2. Determinación de cenizas totales	42
6.1.3. Determinación de cloruros	43
6.1.4. Determinación de grasa butírica	45
6.1.5. Determinación de proteína total	47
6.1.6. Determinación de carbohidratos totales	48

	página
6.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	
6.2.1. Determinación de pH y acidez	51
6.2.2. Determinación de la actividad acuosa	53
6.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
6.3.1. Extracción de polifenoles	58
6.3.2. Determinación de Polifenoles totales	58
6.3.3. Actividad antioxidante cualitativa	63
6.3.4. Actividad antioxidante cuantitativa	
6.3.4.1. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH	65
6.3.4.2. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS	73
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	81
CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS	83
ANEXOS	
ANEXO A. PRODUCCIÓN NACIONAL DE LECHE	84
ANEXO B. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE LECHE	85
ANEXO C. CURVAS PATRÓN.	86
BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1.1. Sierra de Jalmich	8
Figura 1.2. Diagrama general de elaboración del queso Cotija Región de Origen	12
Figura 1.3. Biosíntesis de algunos compuestos fenólicos.	16
Figura 1.4. Clasificación de compuestos fenólicos y compuestos relacionados.	17
Figura 1.5. Estructura de algunos antioxidantes	21
Figura 1.6. Mecanismo de reacción de los antioxidantes.	22
Figura 1.7. Mecanismo de acción del radical DPPH	25
Figura 1.8. Mecanismo de reacción radical ABTS ⁺	26
Figura 4.1. Diagrama para la determinación proximal y fisicoquímica	29
Figura 4.2. Diagrama para la determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante	30
Figura 5.1. Formación del cromato de plata	36
Figura 6.13. Actividad antioxidante cualitativa de distintas muestras de queso Cotija	64
Figura 6.14. Actividad antioxidante cualitativa de distintas muestras de leche	64
Figura 6.15. Actividad antioxidante cualitativa de distintas muestras de suero	64
Figura 6.16. Cinética de la actividad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de quesos	66
Figura 6.17. Cinética de actividad secuestrante por el radical DPPH de distintas muestras de leche	69
Figura 6.18. Cinética de actividad secuestrante por el radical DPPH de distintas muestras de suero	71
Figura 6.19. Cinética de actividad secuestrante por el radical ABTS de distintas muestras de queso	74
Figura 6.20. Cinética de actividad secuestrante por el radical ABTS de distintas muestras de leche	76
Figura 6.21. Cinética de actividad secuestrante por el radical ABTS de distintas muestras de suero	78

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	página
Gráfica 6.1. Contenido de humedad de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	40
Gráfica 6.2. Contenido de cenizas BS de los quesos de Jalmich, San Juan y Chiapas	43
Gráfica 6.3. Contenido de cloruros BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	44
Gráfica 6.4. Contenido de grasa BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	46
Gráfica 6.5. Contenido de proteína BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	47
Gráfica 6.6. Contendio de carbohidratos BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	49
Gráfica 6.7. pH de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	51
Gráfica 6.8. Contenido de acidez de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	52
Gráfica 6.9. Actividad acuosa de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas	54
Gráfica 6.10. Concentración de PF en los diferentes quesos	59
Gráfica 6.11. Concentración de PF en las diferentes leche	60
Gráfica 6.12. Concentración de PF en el suero	62
Gráfica 6.13. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de queso Cotija	67
Gráfica 6.14. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de leche	70
Gráfica 6.15. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de suero	72
Gráfica 6.16. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de distintas muestras de queso	75
Gráfica. 6.17. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de distintas muestras de leche	77
Gráfica. 6.18. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de distintas muestras de suero	79

ÍNDICE DE TABLAS

página

Tabla 1.1.	Composición promedio de la leche cruda de algunas razas vacunas	5
Tabla 1.2.	Componentes afectados por el periodo de lactancia	5
Tabla 1.3.	Composición química del queso tipo Cotija	10
Tabla 5.1.	Datos de las muestras de queso	31
Tabla 5.2.	Datos de las muestras de leche bronca	31
Tabla 5.3.	Datos de las muestras del lactosuero	32
Tabla 6.1.	Estimación de carbohidratos (g/100 g de materia seca)	49
Tabla 6.2.	Composición proximal de los quesos de Jalmich, San Juan y Chiapas (g/100 g queso)	50
Tabla 6.3.	Relación de la actividad acuosa teorica y experimental	56
Tabla 6.3.	Composición química promedio del queso Cotija Región de Origen oreado	56
Tabla 6.5.	Similitud del queso Cotija con otros quesos de pasta dura	57
Tabla B.1.	Producción nacional de leche de vaca	84
Tabla B.2.	Principales estados de mayor producción de leche	84

RESUMEN

En la primera parte del estudio se analizaron muestras de queso Cotija Región de Origen oreados (aprox. 3 meses de maduración), con el fin de establecer la composición química promedio. Éstos tuvieron una humedad de 32-40% (estufa al vacío), 39% mínimo de proteína BS (método de Kjeldahl), 37% mínimo de grasa BS (método de Gerber-Vangulik), 8.7-11.2% de cenizas BS (mufla 550 °C), 4.7-7.4% de cloruros BS (método de Mohr) y 0.12-0.24% de carbohidratos BS (método de fenol-sulfúrico); así como un máximo de $a_w=0.90$, un $pH=4.8-5.2$ y 0.20-0.32% de ácido láctico. Con un aporte energético teórico mínimo de 324 Kcal/100 g queso.

Los productos analizados presentaron una diferencia significativa en sus componentes principales, específicamente en el contenido de grasa, proteína, carbohidratos, humedad y cloruros ($\alpha=0.05$). Por lo que se recomendaría a los productores estandarizar el proceso de elaboración para la obtención de un producto más homogéneo.

También se analizó un queso Cotija adquirido en el mercado de San Juan que, de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede pensar que pertenece a algún productor de la región de Jalmich debido a que en la mayoría de los parámetros analizados no presentó diferencias estadísticamente significativas con los quesos de esa región.

Por último, se analizó un queso de apariencia similar al Cotija y se observó que en composición era diferente estadísticamente con el resto de las muestras analizadas.

En la segunda parte del estudio, se analizaron las mismas muestras de queso Cotija con el fin de conocer si contenían algunos compuestos fitoquímicos (específicamente polifenoles) que pudieran tener actividad antioxidante, por ser ésta una propiedad benéfica para conservar la calidad del alimento y la salud del consumidor. Se encontró que estos compuesto estaban en concentraciones promedio de 1.3 mg ácido gálico/g queso, que a 200 ppm presentaban una actividad antioxidante media de 44.7% en la fracción etanólica y 43.4% en la fracción acuosa, mediante el ensayo del radical DPPH y; 64.7% en la fracción etanólica y 45.3% en la fracción acuosa, con el ensayo del radical ABTS. Estas diferencias están dadas por la naturaleza de cada ensayo.

Así mismo, se analizaron diversas muestras de leche obtenidas de la región de Jalmich de ganado alimentado mediante libre pastoreo en comparación con una muestra de leche de ganado estabulado, en donde se encontró que las muestras de la región de Jalmich contenían una concentración promedio de compuestos fenólicos de 0.6 mg ácido gálico/g leche, que a 200 ppm presentaban una actividad media de 50.3% en la fracción etanólica y 49.3% en la fracción acuosa mediante el ensayo del radical DPPH y 52.1% en la fracción etanólica y 55.5% en la fracción acuosa con el ensayo del radical ABTS. En cuanto a la muestra de establo, se encontró una

menor actividad antioxidante con ambos métodos, en comparación con las demás muestras analizadas (32.5% en la fracción etanólica y 25.4% en la fracción acuosa mediante el ensayo del radical DPPH y; 34.6% en la fracción etanólica y 35.9% en la fracción acuosa mediante el ensayo del radical ABTS); así como un menor contenido de compuestos polifenólicos (0.3 mg ácido gálico/g).

De acuerdo a estos resultados, podemos decir que el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante dependen principalmente de la raza del ganado y su tipo de alimentación, además de la zona de procedencia de la leche empleada para la elaboración del queso.

Finalmente, se determinó que en el lactosuero obtenido durante la elaboración del queso, se pierden compuestos con actividad antioxidante, ya que están presentes en concentraciones promedio de 0.2 mg AG/g suero, los que a 200 ppm presentaba una actividad de 40.6% en la fracción etanólica y 39.6% en la fracción acuosa mediante el ensayo del radical DPPH y; 40.8% en la fracción etanólica y 41.1% en la fracción acuosa mediante el radical ABTS.

INTRODUCCIÓN

A través de los años, se ha tratado de contribuir con el desarrollo de la actividad lechera de los productores locales y regionales. Una alternativa a ello, es darle valor agregado a la leche mediante la elaboración de quesos que ofrezcan al consumidor un producto con una vida de anaquel prolongada.

En México, aproximadamente, el 14% de la producción nacional de leche se destina a la fabricación de quesos, dentro de los que todavía se encuentran algunos quesos artesanales que, a pesar de no contar con un proceso estandarizado, ni con recursos necesarios para competir con las grandes industrias, son altamente apreciados en mercados locales debido a ciertas características que los distinguen de otros quesos, tal es el caso del queso Cotija.

El queso Cotija es un producto mexicano que se elabora desde hace más de 400 años, pero fue hasta los últimos años que, como resultado de la preocupación por rescatar la tradición de este producto, surgió la “*Asociación Regional de Productores de Queso Cotija*”. Esta asociación ya logró obtener la marca colectiva del queso *Cotija Región de Origen*, exclusivamente para el queso que se produce en la región serrana donde confluyen los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de Jalmich).

El Queso Cotija Región de Origen es un producto elaborado a partir de leche entera, bronca de ganado cebú o criollo, que se alimenta por libre pastoreo dentro de un área delimitada de la Sierra de Jalmich. Su periodo de elaboración se restringe a los meses de julio a octubre debido a que la vegetación con la que se alimenta el ganado es más abundante durante este periodo. Su proceso de maduración se lleva a cabo durante el resto del año, con lo que se logra la obtención de un producto con ciertas características distintivas.

Este queso no cuenta con un proceso estandarizado de elaboración, ni una norma técnica oficializada que se aplique en el ámbito nacional; además la leche del ganado con que se produce tiene una composición variable, por lo que resulta de interés determinar la composición proximal de diversos quesos elaborados por productores pertenecientes a la “*Asociación Regional de Productores de Queso Cotija*”, quienes se jactan de ser los productores auténticos; además de determinar algunos parámetros fisicoquímicos importantes como el pH, acidez, a_w y contenido de cloruros. Todo ello, con el fin de obtener la proporción de los componentes principales del *Queso Cotija Región de Origen*, que podrían ser de utilidad para la estandarización del producto y así evitar la denominación “queso Cotija” a los quesos que difieran del auténtico, con lo que se protegería la propiedad del proceso.

Por otro lado, al tomar en cuenta que existen diversos productos lácteos considerados como *Alimentos Funcionales* por contener ciertos compuestos benéficos para el mantenimiento de la salud y óptimo bienestar del consumidor, además de que en la actualidad estos compuestos han cobrado mayor importancia en el mercado, surge la inquietud de realizar un estudio preliminar sobre el queso Cotija, la leche y el lactosuero ya que se esperaba encontrar la presencia de algunos compuestos fitoquímicos, como los polifenoles, que mediante diferentes mecanismos presentan actividad antioxidante proveniente del tipo de alimentación del ganado productor de leche.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. QUESO

1.1.1. DEFINICIÓN

El término “queso” se refiere al resultado de la concentración selectiva de las proteínas de la leche de vaca o de otras especies animales, para la formación de la cuajada (producto de la coagulación de la caseína y separación del suero) debido a la acción del cuajo, microorganismos lácticos, enzimas o ácidos orgánicos comestibles; con o sin tratamiento térmico. Esta cuajada es cortada, desuerada, salada, prensada o no, sometida o no a un proceso de maduración bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar, cambios físicos y bioquímicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, con lo que los quesos pueden o no requerir condiciones de refrigeración. [5,15,80]

1.1.2. CLASIFICACIÓN

Las modificaciones realizadas durante el proceso de elaboración dan lugar a una amplia variedad de quesos que se ajustan al gusto del consumidor, por lo que pueden ser clasificados de acuerdo a las características de composición o elaboración de éstos, dependiendo del criterio de cada autor.

A continuación se muestran algunas clasificaciones empleando diferentes criterios [2,15,130]:

- a) Tipo de materia prima. De acuerdo al tipo de leche empleada: leche de vaca, cabra, oveja, etc.
- b) Tipo de coagulación. De acuerdo al tipo de coagulación empleada para la obtención de la cuajada: por acidificación, por adición de cuajo o la combinación de ambos.
- c) Tipo de pasta. Consistencia: untable, friable, hilada, etc.
- d) Contenido de humedad. De acuerdo a la cantidad de humedad presente en el producto: fresco (73-87%), blando (48-76%), semiduro (42-52%), duro (30-40%), extraduro (<31%).
- e) Grado de maduración: Por ejemplo, para el caso del queso Cotija se clasifica en: fresco (<3 meses), oreado o añejo (3-6 meses), seco o rendido (>6 meses).
- f) Tipo de maduración. Por bacterias, mohos o la combinación de éstos.
- g) Contenido de grasa. De acuerdo a la cantidad de grasa presente: doble crema (65-85%), crema (50-65%), grasos (40-50%), semigrasos (10-25%), magros (<10%).

Por otro lado, en la NOM-121-SSA1-1994, clasifican a los quesos de acuerdo a su proceso en:

- * Fresco (frescales, de pasta cocida, y acidificados)
- * Maduros (prensados, prensados de pasta dura y de maduración con mohos)
- * Procesados (fundidos y fundidos para untar)

1.1.3. IMPORTANCIA

La importancia de la elaboración de quesos radica en su capacidad de conservar las características nutritivas de la leche por un periodo largo. Dato importante si recordamos que la leche es considerada como el mejor alimento natural debido a que contiene cantidades importantes de 55 nutrientes esenciales para el hombre, a pesar de ser deficiente en vitamina D y hierro. [5,14]

El queso constituye una fuente concentrada de proteínas (principalmente, caseína) que contiene todos los aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Lys, Tre, Trp, Phe, Trp y Val) y nitrógeno inorgánico, que compensa la ligera deficiencia de aminoácidos sulfurados (Met y Cys) de la caseína. La proteína constituye un tipo de materia plástica elemental sobre la que se estructuran casi todas las funciones celulares, es muy digerible (aunque la digestibilidad puede disminuir tras el procesamiento) y juega un papel energético secundario. [109,127]

El queso también es una fuente importante de vitaminas (excepto la vitamina C, que se destruye en el proceso de fabricación) que sirven para el mantenimiento de la salud; así como fuente de minerales (Ca, Fe, P, etc.). [2,49]

También es una fuente de ácidos grasos esenciales y aporte energético, que varia dependiendo de la concentración de la grasa presente en la leche que se utiliza como materia prima. Generalmente, en la leche de vaca, el 2% del total de ácidos grasos corresponde a ácidos grasos poliinsaturados y el 70% a ácidos grasos saturados. [36,110]

El contenido de lactosa en el queso es despreciable ya que ésta se ha perdido en el lactosuero o se ha convertido en ácido láctico o lactatos durante su elaboración y maduración, lo que lo convierte en un producto adecuado para ser consumido por personas lactasa-deficientes. [49]

El queso además de presentar una gran variedad en composición y valor nutrimental tiene una diversidad organoléptica, lo cual es muy importante para el mercado en general.

Finalmente, el queso también es importante porque permite agregarle valor a la leche fluida, de manera que genere mayor utilidad y rentabilidad al sistema productivo lo que, en última instancia, puede estimular el interés y permanencia de los productores en la actividad quesera. [5,105]

1.1.4. CALIDAD

La calidad integral de los quesos comprende la calidad microbiológica, sensorial, fisicoquímica y composicional del queso. Sin embargo, para la determinación de la calidad básica del queso se considera principalmente la composición de sus principales constituyentes, es decir, humedad, materia grasa, proteínas, cenizas y dentro de éstas, la sal (NaCl); así como la acidez, el pH y la actividad de agua (a_w). [14,130]

A continuación se describe de manera general a cada uno de estos parámetros:

- ★ **Actividad acuosa y NaCl.** Del total de humedad presente en un alimento, no toda el agua esta disponible para reaccionar ya que la mayoría se encuentra unida a las macromoléculas presentes en el alimento (proteínas, carbohidratos y otros componentes hidrosolubles); sólo una fracción muy pequeña corresponde al agua disponible utilizada por los microorganismos para su crecimiento y mantenimiento de sus funciones metabólicas, es por ello que la actividad acuosa está relacionada con el crecimiento microbiano. Además, esta agua influye en diversas reacciones enzimáticas y no enzimáticas. En otras palabras, este parámetro se relaciona con la estabilidad física, química, bioquímica y microbiológica de los alimentos. [102, 107]

Esta disponibilidad de agua se mide mediante la actividad acuosa (a_w), el cual es un concepto termodinámico, definido por el relación entre la presión de vapor del agua presente en un sistema (p) y la presión del agua pura (p_o), bajo condiciones idénticas de presión y temperatura (ver Ecuación 1.1). [14,107]

$$a_w = \frac{P}{p_o} \quad 0 \leq a_w \leq 1$$

Ecuación 1.1. Actividad Acuosa

Por otro lado, la actividad acuosa además de estar relacionada directamente con el contenido de humedad, también está relacionada de manera inversa con el contenido de sal, es por ello que diversos autores proponen calcular el valor del a_w mediante ecuaciones empíricas en donde influyen factores de composición (contenido de agua, NaCl, cenizas, nitrógeno no proteico, etc.), como la expresión que relaciona el contenido de NaCl y el agua presente en el queso (ver Ecuación 1.2) [14,107]:

$$a_w = 0.997 - 0.604 * X_{NaCl} \quad \text{Donde } X_{NaCl} = \text{kg}_{NaCl} / \text{kg}_{\text{agua}}$$

Ecuación 1.2. Relación del a_w y NaCl

Por consiguiente, la sal también es un factor de control para mantener la calidad del producto ya que al regular la actividad de agua (a_w), se selecciona la microbiota del queso y, por lo tanto, se controla la fermentación y la maduración. Además, la sal proporciona características de sabor al alimento. [42,107]

- ★ **Potencial de hidrógeno (pH).** Se define como el logaritmo común del número de litros de disolución que contienen un equivalente gramo de iones hidronio (ver Ecuación 1.3.). [42]

$$pH = -\log H_3O^+$$

Ecuación 1.3. Potencial de hidrógeno

El pH es un factor significativo que condiciona el desarrollo microbiano, controla el tipo de fermentación y la actividad de las enzimas durante la producción y maduración del queso. Es responsable de promover una serie de reacciones bioquímicas complejas, las cuales son vitales en el desarrollo del sabor y la textura; así como de características particulares de cada variedad de queso [43]. En promedio, los valores del pH oscilan entre 4,7 y 5,5 en la mayoría de los quesos. [131]

- ★ **Acidez (% ácido láctico).** La acidez es la capacidad de un compuesto en medio acuoso para reaccionar cuantitativamente con los iones hidroxilos. Además de ser una de las características fisicoquímicas de los productos lácteos que se relaciona con los sólidos totales no grasos, especialmente proteínas y con la degradación de las mismas por la actividad de la microbiota que los habita normalmente durante el proceso y maduración. [5,78]

Esta acidez esta dada por el consumo de lactosa debido a la acción de los microorganismos, que producen principalmente ácido láctico. Aporta ciertas características que influyen en el sabor y textura del queso, además de presentar un efecto inhibitor en el crecimiento de cierto tipo de microorganismos que producen gas, sabores y aromas indeseables. [47,115]

- ★ **Humedad.** Favorece el desarrollo microbiano. Las cuajadas con mayor contenido de humedad maduran rápidamente, mientras que en las muy desueradas el período de maduración se prolonga considerablemente ya que el agua libre determina la velocidad de las reacciones y microorganismos presentes durante toda la etapa de maduración. También interviene en características sensoriales (masticabilidad, dureza, textura, etc.) del producto final. [43,109]
- ★ **Cenizas, grasa, proteína, carbohidratos.** Estos componentes están relacionados directamente con la calidad de la materia prima. Proporcionan características específicas en el queso, como textura, sabor, aroma, valor nutritivo, etc. [43,130]

1.1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DEL QUESO

La calidad del queso puede ser afectada por diversos factores entre los que se encuentran:

- ★ **FACTORES DE PRODUCCIÓN.** La producción y composición del queso depende de la producción y composición de la leche, que a su vez varía en función de diversos factores [36], como:
 - * **La raza de la vaca.** El rendimiento anual y la composición de la leche puede llegar a variar significativamente de una raza respecto a otra, por ejemplo en el contenido de grasa. [39]. Lo que puede ser útil para diferenciar razas comparadas entre si. (ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Composición promedio de la leche cruda de algunas razas vacunas

RAZA	COMPOSICIÓN (g/100 g de producto fresco)				
	Agua	Grasa	Proteína	Lactosa	Cenizas
HOLSTEIN	87.0	4.2	3.4	4.7	0.75
JERSEY	85.4	5.3	3.9	4.7	0.75
PARDA SUIZA	87.1	3.9	3.5	4.6	0.75

FUENTE: [23,109]

- * **La edad de la vaca.** La producción de leche puede aumentar, gradualmente, desde el 1^{er} parto hasta el 4^{to}-6^{to} y posteriormente disminuir. En cuanto a la composición, la grasa disminuye conforme avanza la edad. [92]
- * **Individualidad.** Se ha observado que, vacas de la misma raza, misma edad, con peso equivalente, sometidas a un régimen y a una alimentación idénticas presentan, en el mismo periodo de lactancia, diferencias desde el punto de vista de la calidad de la leche, ya sea por factores genéticos (variación de 1-2% grasa); o bien, de la microbiota intestinal (variación de vitaminas). [66]
- * **Manejo.** Si los intervalos entre ordeñas son cortos, hay menor producción de leche. La leche tiende a aumentar en contenido de grasa en el curso de la ordeña, pero la leche de una ordeña incompleta puede resultar semi-descremada. Por otra parte, la ordeña completa induce la secreción, de ahí su importancia en el aspecto productivo. En caso de no realizarse la ordeña resulta inhibida la producción de leche. [5,109]
- * **Estado sanitario.** De acuerdo a la salud del animal, podría disminuir la concentración de los compuestos, por ejemplo, la grasa disminuye durante los estados patológicos. [39,65]
- * **Periodo de lactancia¹.** En general, la producción máxima se encuentra en los primeros 3 meses, así como en las primeras 6 lactaciones; posteriormente decae. [93]

La variación en la composición de la leche se muestra en la *Tabla 1.2*.

Tabla 1.2. Componentes afectados por el periodo de lactancia

COMPONENTE	CARACTERÍSTICAS
Proteínas	Disminuye en el primer mes y aumenta a lo largo de la lactación, aunque las proteínas del lactosuero presentan mayor concentración en los primeros días después del parto
Grasa	Máxima cantidad en el calostro. Disminuye a lo largo de la lactación y aumenta al final de ésta
Minerales	Menor cantidad al principio y final de la lactación
Carbohidratos	Aumentan durante la fase calostrada y en el 1 ^{er} mes, posteriormente se mantienen constantes

FUENTE: [65,39]

¹ Periodo que comprende desde el primer día de parto hasta la época que la vaca cesa de dar leche.

-
- ★ **FACTORES DE PROCESO.** Existen diversas etapas de la elaboración del queso que modifican las características finales del producto [39,41,130] como:
- * **Cortado.** Dependiendo lo fino del corte que realice el productor en la cuajada se favorece el desuerado que, finalmente, se ve reflejado en el porcentaje de humedad final.
 - * **Salado.** Dependiendo de la concentración de sal que agregue el productor, se modifican las características sensoriales; así como, la humedad del queso.
 - * **Desuerado y prensado.** Influye dependiendo la presión que se ejerza sobre la cuajada que, finalmente, se traduce en el contenido de humedad.
 - * **Madurado.** Dependiendo del tiempo y temperatura, los microorganismos presentes darán al producto cierta acidez, textura, sabor y aroma. En esta operación se suele perder humedad y vitaminas, como la riboflavina.
- ★ **FACTORES AMBIENTALES.** El clima, suelo, explotación agrícola son algunos de los factores que influyen en la calidad de los quesos. [66]
- * **Situación geográfica, estación y clima.** En general, la producción de leche tiende a aumentar en verano y disminuir en invierno y, en forma inversa, el contenido de grasa y sólidos de la leche se hace mínima durante el verano y tiende a aumentar durante el invierno. También se dice que la leche es mas rica en grasa por las tardes. [5,65]
 - * **Sistema de alimentación** (ver Anexo A), Dependiendo de la cantidad y composición del alimento, cambia la producción y composición de la leche; por ejemplo, si se reduce la cantidad de alimento, disminuye la producción, aumenta el porcentaje de sólidos pero no hay gran disminución de grasas. En cambio, si es insuficiente la presencia de vegetales verdes en la alimentación, se tendrá un descenso en la producción de leche, debido a que la fermentación en el rumen no es efectiva pues disminuye la formación de ácido acético y otros ácidos que son los principales formadores de ácidos grasos. [23,36,57]

1.1.6. PRODUCCIÓN

En México, según Villegas, aproximadamente el 14% la producción nacional de leche (ver Anexo B) se destina a la fabricación de quesos, dentro de los que todavía encontramos una variedad de **quesos artesanales**, carentes casi siempre de control de calidad, producidos por la pequeña y mediana industria. Es por ello que el producto final frecuentemente muestra heterogeneidad en su composición química y organoléptica, además de una limitada conservación; sin embargo, poseen una fuerte raíz histórica nacional. [15,130]

A nivel artesanal, principalmente, el dominio de los métodos operativos involucrados durante la manufactura de un producto es el resultado de la repetición y práctica, donde la gente que

interviene se caracteriza por sus habilidades. Es común observar que en las queserías artesanales se carece de componentes tecnológicos importantes, como manejo de información, organización para la producción y comercialización, estrategias de mercado y de calidad. En este sentido, la tradición quesera mexicana está gravemente amenazada por grandes industrias queseras con las que no pueden competir en costos, volumen de producción, tecnología, infraestructura, etc., por lo que son desplazadas por otro tipo de quesos ya sean importados o de imitación. [25,110]

A pesar de todas estas limitantes, los quesos artesanales presentan un mercado importante para cierto sector de la población, debido a que poseen características distintivas, que si estos productos son rescatados y apoyados podrían llegar a ser de fácil comercialización nacional e internacional, tal es el caso del queso Cotija² (ver Sección 1.2). [25,105]

1.2. QUESO COTIJA

1.2.1. QUESO COTIJA REGIÓN DE ORIGEN

El queso Cotija, es uno de los quesos artesanales que se han sido afectados con la aparición de los quesos producidos por las grandes industrias, por lo que en la actualidad ha surgido el interés, por parte de los productores, de conservar la tradición de este producto.

Un grupo de productores ha luchado por obtener la denominación de origen del queso Cotija, mediante la formación de la “Asociación Regional de Productores de Queso Cotija”. Esta asociación comprende diversos municipios ubicados en las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de JalMich), en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jilotlán de los Dolores y Quitupan, ubicados en Jalisco; así como también los municipios de Tocumbo, Cotija de la Paz y Los Reyes, estos últimos, ubicados en Michoacán (ver Figura 1.1). [3]

Esta delimitación territorial abarca una superficie de 2400 Km², con una altitud aproximada de 700-1700 m sobre el nivel del mar. Factores físicos como la topografía y el clima son traducidos en ciertos parámetros de temperatura ambiental (20-25 °C) y precipitación pluvial anual (900-1200 mm) entre el periodo de julio a octubre, que dan como resultado un rango de humedad relativa específica mayor a 80%, que se relaciona tanto con la calidad del queso elaborado como con las condiciones climáticas necesarias para su añejado. [3]

² Cotija viene de cutixani, palabra de origen chichimeca que quiere decir "lugar donde la garganta está más ensanchada". [136]



Figura 1.1. Sierra de Jalmich

Este espacio territorial es el área geográfica donde pasta el ganado productor de la leche con la que se elabora el queso y donde están ubicados los ranchos de la ordeña y las queserías. La cubierta vegetal de la región es selva baja caducifolia con vegetación secundaria irregular que limita con bosque mixto (encino-pino). [3]

Así mismo, es importante mencionar que, en marzo del 2005, bajo la figura legal de la Sociedad de Producción Rural (SPR-RI) la asociación obtuvo, del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la marca colectiva³ del queso **Cotija Región de Origen** que de alguna manera brinda confianza al consumidor sobre la autenticidad del producto y las características de éste. En cuanto al productor, le permite exigir un sobreprecio justificado por las especificidades geográficas y culturales incorporadas en el producto, así como por las condiciones de producción. Además de poder ampliar su distribución para llegar a nuevos mercados. [3]

El pasado noviembre, el queso Cotija fue reconocido entre 500 participantes como el mejor Queso Extranjero del Año en el campeonato mundial sobre ese derivado de la leche en Cremona,

³ Signo distintivo que sirve para diferenciar en el mercado los productos o servicios de los miembros de una asociación o sociedad respecto de los productos o servicios de terceros. Este símbolo se coloca en el producto para indicar que ha sido elaborado por un grupo específico de personas en una región determinada, dando garantía de autenticidad y calidad a los consumidores. [3]

Italia, por ser un producto único tanto por su sabor como por las características de elaboración. [137]

Por todo lo anterior, es necesario que se garantice la autenticidad del producto con el fin de combatir la competencia de los quesos imitación o los llamados “tipo queso Cotija”, que solo han logrado perjudicar a los productores pertenecientes a la asociación.

1.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El queso Cotija es un producto mexicano artesanal de alta calidad, que tuvo su origen en el estado de Michoacán y Jalisco hace más de 400 años. A través de todo este tiempo ha llegado a elaborarse en otros estados de la República, como los estados de Chiapas y Tabasco, principalmente. [105]

El autentico queso Cotija, según los miembros de la “*Asociación Regional de Productores de Queso Cotija*”, se caracteriza por ser un queso de pasta dura, prensada, no cocida, madurada que se elabora a partir de leche entera, cruda de vaca, de ganado criollo de doble propósito (pardo suizo-cebú, Holstein-Cebú). Su tiempo de elaboración se delimita a la época de lluvias (julio a octubre), debido a que, como el ganado se alimenta mediante el sistema de libre pastoreo, la abundancia de pastizales en esta época, conlleva a un aumento de la producción de leche. [3]

Asimismo, este queso posee una pasta friable, ácida y con un elevado porcentaje de sal (4-6%). Presenta una forma cilíndrica (40 cm de diámetro y 20 cm altura, en promedio) y gran peso (alrededor de entre 20 y 30 kg). El tiempo de añejamiento dura 3 meses como mínimo (a $T=25^{\circ}\text{C}$, $HR=90\%$, en promedio), pero esta maduración puede continuar hasta que el queso queda casi seco; adquiriendo una textura firme, un color blanco-amarillento agradable; así como un sabor y aroma pronunciado. [3,105]

1.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Desde el punto de vista fisicoquímico el queso, en general, se describe como un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína, integrada en un complejo caseinato-fosfato-cálcico que, por coagulación, engloba glóbulos de grasa, agua, lactosa, albúminas, globulinas, minerales, vitaminas y otras sustancias menores de la leche, las cuales permanecen adsorbidas en el sistema o se mantienen en la fase acuosa retenidas. [2,66]

En la actualidad, no existen estudios publicados que muestren la composición química del autentico queso Cotija; sin embargo en un estudio previo se reporto la composición química promedio de un queso tipo Cotija (*ver Tabla 1.3*), lo cual podría darnos una idea general del producto en cuestión, como son el alto contenido de proteína, grasa y sal; así como una consistencia dura, dependiendo del grado de maduración. [105]

Tabla 1.3. Composición química del queso tipo Cotija

COMPOSICIÓN (g/100 g producto fresco)						
Agua	Sólidos Totales	Grasa	Proteína total	Cenizas	Sal	pH
8	62%	24	28.5	7.5	4.4	5.2

FUENTE: [105]

Actualmente, la asociación cuenta con un manual de Reglas de Uso en donde establecen que la composición base para el queso Cotija Región de Origen es: humedad máxima 36%, grasa mínima 23% y proteína mínima 25%, estos últimos expresados en base humedad (BH), por lo tanto en base seca (BS) corresponderían a 35.9% de grasa mínima y 39% de proteína mínima. [3]

1.2.4. PROCESO DE ELABORACIÓN

En agosto del 2006, se realizó una investigación de campo con algunos productores de la región de Jalmich en la que se reiteró que el proceso de elaboración de queso Cotija es un proceso artesanal y tradicional, en el cual los productores hacen variaciones de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura.

A continuación se muestra el procedimiento general de la elaboración de este queso conjuntado lo descrito en la literatura [3] con la investigación de campo (*ver Figura 1.2*).

★ **ORDEÑA.** La leche empleada para la elaboración del queso Cotija deberá ser recién ordeñada del día, de ganado criollo o híbrido, durante los meses de lluvia (junio a noviembre). Las vacas deberán estar sanas.

Esta operación se lleva a cabo, generalmente, entre 7 y 9 a.m., en donde el operario deberá asear sus manos, así como la ubre de la vaca con agua pura y un lienzo limpio, antes de su realización. La leche recién ordeñada presenta un pH=7 y una temperatura de 37-38°C.

NOTA: La persona que efectúe la ordeña no podrá acarrear al resto del ganado para evitar la contaminación cruzada.

★ **RECEPCIÓN.** La leche deberá ser una secreción opaca de color blanco a blanco amarillento (color que se debe a los carotenos de la fase oleosa y a la riboflavina de la fase acuosa). También debe tener un olor poco marcado, pero característico a leche fresca. Su gusto debe ser agradable y ligeramente dulce; aunque, es normal que presente cierto grado de acidez.

Así mismo, deberá estar libre de materia extraña (pelo, insectos, estiércol, etc), por lo que los operarios la filtran en cedazos limpios.

★ **REPOSO.** Se mezcla la leche y se deja reposar, usualmente, en tinas de acero inoxidable, durante aproximadamente, 3-4 h a temperatura ambiente (la leche alcanza una temperatura alrededor de 34°C y un pH cercano a 7). En este periodo la microbiota natural se multiplica.

★ **CUAJADO.** Esta operación se realiza mediante una coagulación enzimática, que consiste en añadir el agente coagulante, denominado cuajo⁴, a la leche. En el queso Cotija debe de ser de origen animal (Cuamex, cuajo XXX estandarizado)

El cuajo es incorporado y mezclado rápidamente, aunque su dosificación no está estrictamente controlada (10 mL cuajo/100 L leche) por lo que se obtienen tiempos y puntos de coagulación variable, que también se ven afectados por la temperatura, la acidez y la concentración de ciertos minerales (calcio y fósforo, principalmente). Estos factores influyen en la firmeza del cuajo y la textura de la cuajada formada. Generalmente, para este queso, el tiempo de cuajado es alrededor de 1 h, por lo que la cuajada no es tan ácida y, por consiguiente, no se desmineraliza demasiado.

★ **CORTADO.** Esta etapa consiste en la división del coágulo en porciones menores con objeto de favorecer la evacuación del lactosuero⁵ desde el interior de la cuajada, debido a que los geles enzimáticos se contraen mucho. Para este caso, el productor verifica la consistencia de la cuajada utilizando una cuchara o un cuchillo (esterilizado). Una vez alcanzado el punto deseado se prosigue al cortado. Este corte es efectuado lentamente en cuadros con ayuda del cuchillo o una cuchara, cuidando de no deshacer el coágulo, porque de lo contrario, se formarían granos irregulares que desuerarían con dificultad. Aunque, en ocasiones, el productor corta la cuajada de diferente forma por ejemplo, en forma de estrella o cruz.

★ **DESUERADO.** Consiste en la separación del lactosuero que impregna el coágulo después de la rotura mecánica. Se obtiene la parte sólida previamente asentada que constituye la cuajada, debido a que el coágulo resultante es inestable. Para este caso, los productores recurren a acciones mecánicas para permitir la salida de este componente acuoso, por medio de drenado sobre la mesa o artesa (madera o acero inoxidable), por un colador interpuesto (lienzo limpio) o ejerciendo una presión descendente con una cuchara de acero inoxidable o con un recipiente limpio.

★ **MANTEADO.** Se utiliza una tela de algodón, para desuerar la cuajada por auto-compresión y se deja escurrir en las mesas de acero inoxidable.

★ **CORTADO O QUEBRADO.** Esta operación consiste en romper la cuajada obtenida, de manera manual (corte tosco) o con un cuchillo (cortes amplios), para favorecer un poco más el desuerado por exudación sobre una mesa de acero inoxidable, la cual es lavada previamente con agua hirviendo o con el mismo lactosuero obtenido en la operación anterior.

⁴ Enzima proteolítica que actúa desestabilizando a la solución coloidal de caseína, originando la aglomeración de las micelas libres y la formación de un "gel" o coágulo en que quedan atrapados el resto de los componentes de la leche (grasa, proteínas, lactosa, sales, agua, microorganismos). [49]

⁵ Subproducto de la elaboración del queso compuesto por lactosa y sales, principalmente. [127]

- ★ **SALADO.** La sal de grano (proveniente del estado de Colima) se incorpora directamente (libre de materia extraña) a la cuajada y se amasa manualmente para homogenizarla. Esta operación es vital, pues, además de brindar un sabor característico, la sal regula el desarrollo microbiano, suprime el desarrollo de bacterias indeseables y controla el crecimiento de los agentes de la maduración, además de contribuir con la pérdida de suero. Sin embargo, la dosificación de la sal no se realiza de manera precisa pues depende de cada quesero, que a pesar de contar con “medidores muy rústicos”, no siempre lo utilizan. Sin embargo, se calcula que la cantidad incorporada es entre 138-140 g por cada 20 L de leche.

NOTA: En algunas ocasiones, la cuajada ya salada, se deja reposar sobre la artesa a temperatura ambiente para incorporar al día siguiente una cantidad equivalente de ésta y así obtener el queso del tamaño deseado.

- ★ **MOLDEADO.** En este caso, se coloca la cuajada, envuelta en 2 piezas de yute o ixtle (fibra de maguey), dentro de molde de acero inoxidable de forma cilíndrica y gran tamaño.

El objetivo de esta operación es darle forma al producto (40 cm de diámetro y 20 cm altura, con un peso entre 20-30 kg).

- ★ **PRENSADO.** Tiene por objeto eliminar el suero intersticial de la masa del queso mediante presión sobre la cuajada; se realiza generalmente empleando piedras, de entre 50 y 90 kg (en algunas ocasiones se emplea prensas rústicas de tornillo). El prensado dura entre 18 y 24 horas. Durante esta operación el queso se voltea continuamente.

- ★ **OREADO.** Las piezas de quesos se desmoldan y se les elimina los rebordes. Se "fajan" con unos "cinchos" de fibracel, fibra de vidrio, lamina o tela para mantener la forma y se mantiene así por varios días (15, aproximadamente), a temperatura ambiente (entre 20 y



Figura 1.2. Diagrama general de elaboración del queso Cotija Región de Origen

40°C). Diariamente, las piezas se descinchan, se voltean y se vuelven fajar. En esta etapa, la cuajada presenta un volumen y forma ya determinadas.

- ★ **MADURACIÓN.** Esta es la última fase de la fabricación del queso, en donde la pieza de queso se desfaja cuando la textura es la adecuada. Sin embargo, se continua el proceso del volteado, aproximadamente, cada tercer día, limpiando la superficie con un lienzo limpio y suave, cuidando que no se produzca una contaminación por plagas (moscos, insectos, etc.). Esta operación durante 3 meses como mínimo para garantizar su inocuidad y calidad antes de enviar el producto al mercado.

La maduración comprende una serie de transformaciones físicas, químicas y bioquímicas (glucólisis, proteólisis, lipólisis), aunado a que el queso pierde peso por evaporación del agua que contenía, lo que conlleva a cambios en las propiedades físicas y químicas, en donde el queso adquiere su aspecto, textura y consistencia, así como su aroma y sabor característicos. Todos estos cambios dependen de diversos factores entre los que se encuentran: aireación, humedad, sal, pH, a_w , y temperatura. [11,92]

- ★ **VENTA Y DISTRIBUCIÓN.** Después de, al menos, 3 meses de maduración, el producto se encuentra listo para su consumo ya sea para autoconsumo o mediante la venta de tiendas locales, ferias, mercados etc. Se almacena sin refrigeración.

Como puede observarse, la leche no sufre ningún tratamiento térmico que le permita asegurar una mejor conservación, producción y comercialización; por lo tanto, se debe tener un severo control higiénico-sanitario, en cada una de las operaciones para evitar contaminación. Por otro lado, la utilización de leche cruda brinda aroma, sabores y textura típicos del producto.

1.2.5. PRODUCCIÓN

Para el caso del queso Cotija, se observa que cuenta con poco abasto de materia prima, poca tecnología y lejanía de los mercados. El aislamiento de los ranchos y la mala infraestructura de los caminos han dificultado la distribución de este producto. Generalmente, el productor participa en varios eslabones de la cadena agroalimentaria, al encargarse de la producción de leche y queso, distribución y venta directa en zonas locales (ventas regionales).

Por ello, los productores de queso Cotija organizan una feria, en la ciudad de Cotija, la cual se lleva a cabo la primera semana de diciembre, con el fin de dar a conocer su producto y poder venderlo. Este producto tiene un futuro muy prometedor por poseer características muy peculiares que lo hacen especial, con lo que podría llegar a ser un producto de fácil comercialización a nivel nacional e internacional.

La producción anual, que es estacional, varía dependiendo de la producción de leche obtenida, que es influenciada por la ganadería extensiva, en la que se utilizan los pastos naturales y

vegetación irregular, por lo que su producción esta sujeta a factores del medio ambiente. Este punto es importante si tomamos en cuenta que día con día, la demanda del queso es mayor que la oferta, por lo que se deben tomar medidas necesarias para cubrir las necesidades del consumidor.

1.3. ALIMENTOS FUNCIONALES

1.3.1. GENERALIDADES

El termino y concepto de alimento funcional tiene su origen en Japón en el año 1984, pero fue hasta en la década de los 90's cuando se presentó un gran auge de estos alimentos en la industria alimentaria, fenómeno que surgió a partir de la preocupación y reconocimiento, por parte del consumidor, organizaciones y gobierno, por el bienestar físico y mental de la población. Sin olvidar el impulso logrado con la ayuda de los grandes avances tecnológicos para su identificación. [27,30,51,113]

Por ello, se generó una área nueva de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición en la que se muestra el papel que juegan ciertos componentes químico-nutricionales en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Así es como surgió un cambio del simple concepto de alimento como fuente de nutrientes a uno más integral que traduce la potencialidad que los alimentos pueden tener, no sólo de nutrir, sino también de prevenir enfermedades como: el cáncer, la hipertensión, sobrepeso, osteoporosis, enfermedades cardiacas y diabetes, entre otras. [8,111,117,128]

Otros factores que contribuyen a la creciente demanda de los alimentos funcionales son el interés del consumidor por extender los años de vida, la desconfianza hacia los alimentos "procesados" y el aumento en el mercado de los alimentos "naturales", lo que ha creado el estado de "revolución" tecno-científica de los "alimentos funcionales" (fenómeno del auto-cuidado); así como el aumento de costos en la salud, la autonomía en el cuidado de ésta y los cambios en la regulación de los alimentos. [4,96,126]

1.3.2. DEFINICIÓN

Existen muchas definiciones para describir lo que son los alimentos funcionales pero para fines de este estudio, alimento funcional se definirá como: *“Cualquier alimento o parte de un alimento, que además de sus componentes nutrimentales, contiene componentes adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental. Ayuda también a la prevención, reducción y tratamiento de enfermedades”* [27,30]

1.3.3. CLASIFICACIÓN

La clasificación de los alimentos funcionales es muy amplia. Entre los componentes más destacables que se encuentran dentro de los alimentos funcionales están la fibra dietética, alcoholes o azúcares de baja energía, aminoácidos, ácidos grasos insaturados (como los Ω -3 y el ácido linoléico conjugado (CLA)), fitoesteroles, vitaminas y minerales, **antioxidantes**, bacterias ácido-lácticas y sustancias excitantes o tranquilizantes (como el vino y el té). [21,113]

De manera general, la base de los alimentos funcionales es, inminentemente, de origen vegetal o fitoquímica (a excepción de los prebióticos y probióticos), por lo que podemos distinguir tres grandes familias o componentes de complementos funcionales: [101]

- * Los probióticos: Microorganismos vivos que proporcionan efectos benéficos sobre la microbiota intestinal provocando un mejor balance microbiológico. Dentro de las especies que encontramos en esta clasificación están *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e incluso sus mezclas. [52,86,120]
- * Los prebióticos: Son sustancias fermentables que tienen un efecto benéfico sobre la microbiota intestinal. Son ingredientes alimenticios no digeribles que proveen un efecto benéfico sobre los probióticos, provocando una estimulación selectiva de su crecimiento. Están constituidos por un grupo heterogéneo de sustancias, tanto desde el punto de vista físico como químico, tal es el caso de los oligosacáridos. [113,120]
- * Los fitobióticos o fitoquímicos: Son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas que, a su vez, pueden clasificarse en: terpenoides, **metabolitos fenólicos**, alcaloides, constituyentes nitrogenados y fibra dietética, tanto por su estructura como por su función. [53,60,73]

Para fines de este estudio, sólo nos centraremos en los **compuestos fenólicos**

1.3.3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

1.3.3.1.1. DEFINICIÓN

Los compuestos fenólicos son el principal grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas. Son de gran importancia para su fisiología ya que funcionan como un mecanismo de defensa, es decir, estos compuestos contribuyen a la resistencia hacia microorganismos e insectos que atacan a las plantas, además de ayudar a preservar la integridad por la continua exposición a condiciones ambientales de estrés (radiaciones UV, altas temperaturas). Se encuentran libres, unidos a la pared celular y/o dentro de las vacuolas. [13,50,73]

Químicamente, los compuestos fenólicos, son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura un anillo aromático bencénico con uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales como ésteres, compuestos metoxilo y glucósidos. Estos compuestos fitoquímicos son un grupo muy diversificado derivado de

la fenilalanina y tirosina, los que se combinan con unidades de acetato (*ver Figura 1.3*) mediante una vía de carbohidratos que es restringida a los microorganismos y a las plantas. Esta es la razón del porqué estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal. [53,73,85,98]

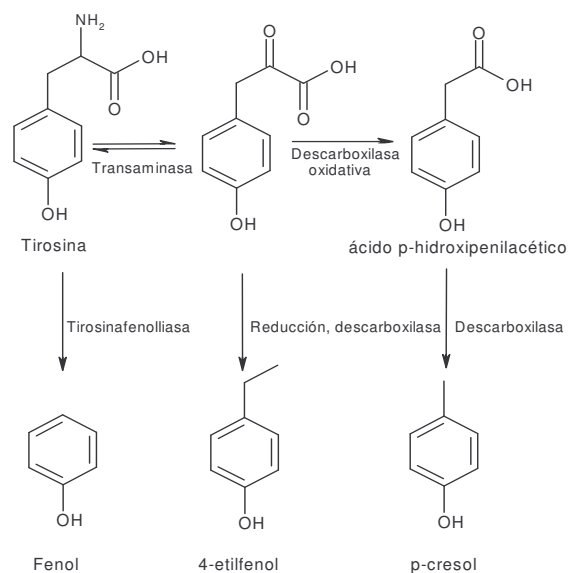


Figura 1.3. Biosíntesis de algunos compuestos fenólicos.

1.3.3.1.2. CLASIFICACIÓN

Hasta el día de hoy, se han encontrado aproximadamente 8,000 estructuras de compuestos fenólicos, los cuales se clasifican según el número de átomos de carbono que poseen en su estructura, variando desde moléculas simples (o fenólicos simples) hasta compuestos altamente polimerizados (más de 2 unidades de fenol) (*ver Figura 1.4*). [1,68,83]

A continuación se muestra la clasificación de estos compuestos fitoquímicos [50,55,68]:

1. Fenoles (cresol, resorcinol), ácidos fenólicos (ácido gálico, vainillínico, ácido hidroxibenzóico e hidroxicinámico) y ácidos fenil acéticos.
2. Ácidos cinámicos (caféico, ferúlico), cumarinas y isocumarinas (se encuentran en forma de glicósidos) y cromonoles (se forman a partir de antocianidinas).
3. Lignanos y neolignanos (formados por acoplamiento oxidativo de unidades de *p*-hidroxifenilpropano, que se unen mediante puentes de hidrógeno).
4. Flavonoides (polifenoles más distribuidos en las plantas que comparten el esqueleto común de difenilpiranos que permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo de pirano: flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonoides, catequinas, antocianidinas, etc.).
5. Taninos condensados o hidrolizables. Compuestos fenólicos hidrosolubles con un gran número de grupos hidroxilo que son capaces de unirse a proteínas u otras macromoléculas. Se pueden

encontrar residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque, en algunos casos, se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático.

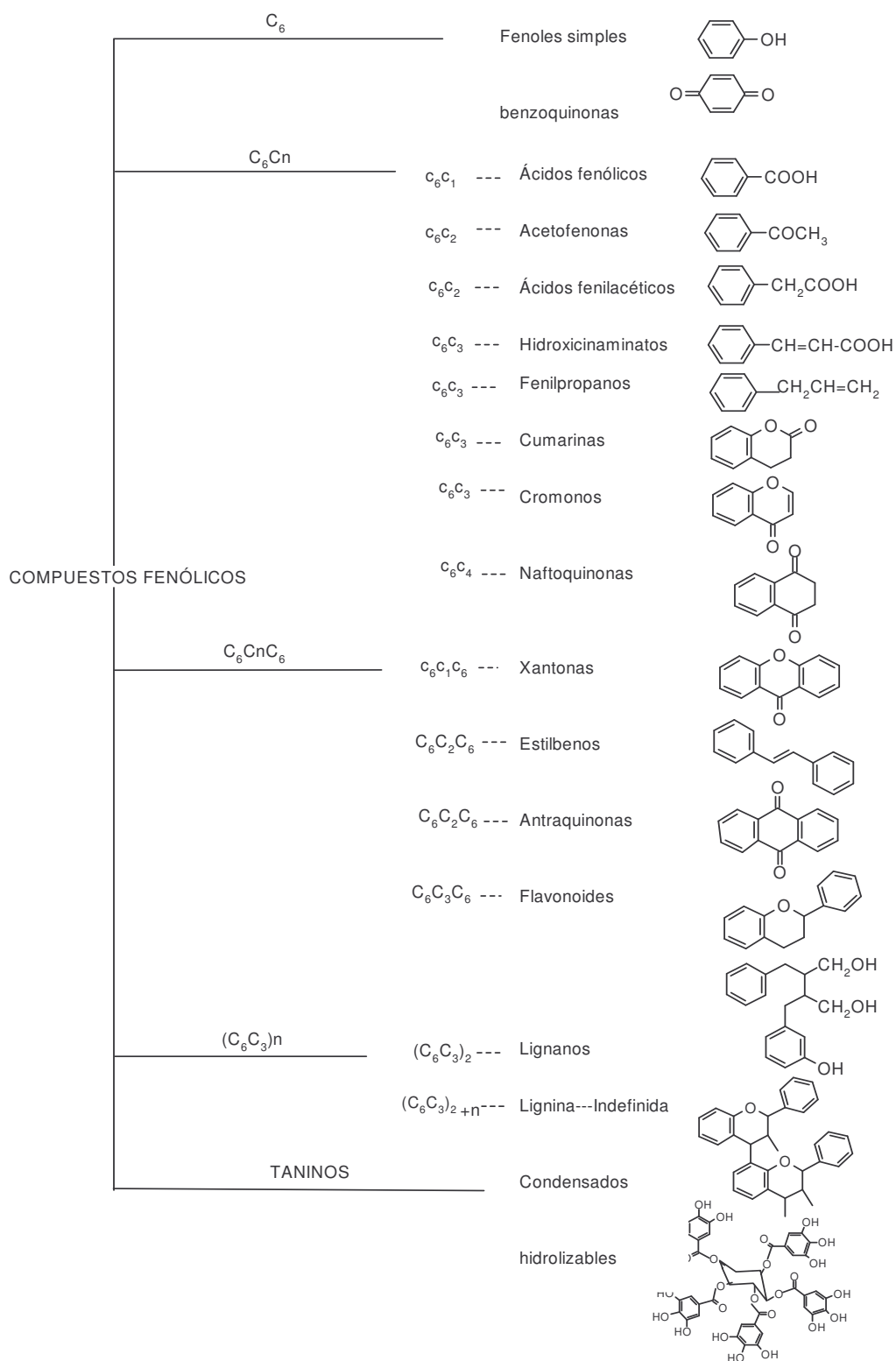


Figura 1.4. Clasificación de compuestos fenólicos y compuestos relacionados.

1.3.3.1.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Generalmente, estos compuestos están presentes en mezclas complejas y son, hasta el día de hoy, pocas plantas de las que se conoce el contenido fenólico. Sin embargo, diferentes estudios han encontrado que, estos compuestos se encuentran como derivados glicosidados, los cuales, según diversas investigaciones sobre la absorción, metabolismo y secreción de los compuestos fenólicos, son las formas que se absorben con mayor facilidad. Dentro de los azúcares asociados a estos compuestos se pueden encontrar monosacáridos, disacáridos e, incluso, oligosacáridos. Sin embargo, los que se encuentran unidos, con más frecuencia, son la glucosa, la galactosa, la arabinosa, la xilosa, los ácidos glucurónico y galacturónico. Así mismo, también pueden encontrarse unidos a ácidos orgánicos, lípidos y otros compuestos fenólicos. [54,59,118,126]

De acuerdo a esta estructura química podemos distinguir a los compuestos fenólicos como solubles y no solubles. Los fenoles solubles, o libres, son compuestos fenólicos de peso molecular bajo o intermedio que pueden ser extraídos al emplear diferentes tipos de solventes como agua o solventes orgánicos. Estos fenoles libres, se encuentran dentro de la vacuola y son absorbidos en el tracto gastrointestinal produciendo efectos sistémicos positivos. Por otro lado, los fenoles no solubles, o enlazados, son los compuestos de alto peso molecular, principalmente del grupo de taninos condensados. Estos compuestos entrelazados se encuentran en las paredes celulares y son recuperados en las heces, ya que no son degradados por las enzimas digestivas, ni son fermentados por la microbiota del colon. [1,56,68]

1.3.3.1.4. ABSORCIÓN Y METABOLISMO

La biodisponibilidad, absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos en los humanos ha sido poco estudiada; sin embargo se sabe es que el principal órgano involucrado en el metabolismo de los polifenoles es el hígado, aunque también se encuentran implicados los riñones y la mucosa intestinal, debido a que contienen enzimas que intervienen en el metabolismo. [38,50]

Dentro de las cosas que se conocen es que los polifenoles extraíbles son metabolizados en el tracto gastrointestinal. Las agliconas y los compuestos fenólicos simples libres pueden ser directamente absorbidos a través del epitelio intestinal y metiladas y/o conjugadas con ácido glucurónico o sulfato en el hígado y que los glucósidos no pueden ser absorbidos en el intestino delgado debido a su naturaleza hidrofílica y su relativo elevado peso molecular, por lo que pasan inalterados al intestino grueso, su hidrólisis ocurre en el colon por microorganismos que producen glicosidas capaces de liberar la aglicona de su azúcar. [85,103,108]

Actualmente, existe un amplio campo de investigación sobre el metabolismo y absorción de los compuestos polifenólicos debido los efectos fisiológicos benéficos que producen.

1.3.3.1.5. IMPORTANCIA

En la actualidad, los compuestos fenólicos han cobrado gran importancia por todas las funciones que desempeñan, es decir, su importancia no solo radica en el papel que juegan en el metabolismo y desarrollo de la planta; sino que también, son importantes por el impacto sobre las características organolépticas y nutrimentales de los alimentos. Sin embargo, el mayor auge del interés de estos compuestos, se debe al descubrimiento de su acción benéfica como alimentos funcionales. [55,68,73,95]

En concreto, su amplio rango de efectos biológicos importantes para los organismos, se debe a su gran variedad estructural. Dentro de estos beneficios tenemos el efecto antibacterial, antialérgico, hepatoprotector, antitrombótico y antiviral; además de su acción como vasodilatador, antimutagénico, antiinflamatorio, anticancerígeno y antioxidante. Este último, es el que brinda la protección de las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo y previene enfermedades crónicas asociadas al estrés como son: el cáncer, aterosclerosis, diabetes, desordenes neurodegenerativos e incluso, también retrasa el envejecimiento. [13,40,60,99,119]

Estos compuestos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en los alimentos de origen vegetal, por lo que forman parte importante tanto en la dieta humana como la animal. [95,111]

En diversos estudios se ha demostrado que la presencia de estos antioxidantes en la alimentación humana presentan la capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo, así como una acción protectora ante el efecto del daño oxidativo en el material genético y la expresión génica; además de poder inhibir la iniciación, promoción y progresión de tumores; aunado a que pueden potenciar el sistema inmune.

En la alimentación animal se han encontrado en los forrajes con los que se alimentan, a ciertos compuestos fenólicos, como taninos condensados, que se ha demostrado que ayudan a incrementar la absorción de aminoácidos en el intestino del animal; además de presentarse ciertos efectos benéficos en su organismo debido a su habilidad de formar complejos con las proteínas y, a la posterior degradación de las mismas por medio de los microorganismos presentes en el rumen. Además de se ha reportado que la ingesta de estos compuestos contribuye con un incremento en la lactación. [1,6]

Retomando su acción como antioxidante, este tipo de compuestos presenta una gran importancia debido a que, hoy en día, se ha incrementado la obtención y preparación de los alimentos con alto contenido de antioxidantes naturales y se ha reducido la utilización de antioxidantes sintéticos, ya que se ha comprobado que presentan cierta toxicidad, lo que ocasiona daños graves a la salud del consumidor (efectos carcinogénicos). Es por ello, que se prefiere el

consumo de antioxidantes naturales sobre los sintéticos. Además de que estos últimos pueden llegar a ser altamente volátiles e inestables a elevadas temperaturas, presentan una menor eficacia y mayor costo de manufactura. Entre los principales antioxidantes sintéticos que podemos mencionar se encuentra el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y el terc-butilhidroquinona (TBHQ). [33,48,68,106,117]

Diversos estudios, han demostrado que los compuestos fenólicos también ayudan a economizar la utilización de la vitamina E y de carotenoides (antioxidantes asociados a las lipoproteínas) ya que su actividad antioxidante es considerada mucho mayor que la encontrada en las vitaminas esenciales, de ahí que contribuye significativamente con los beneficios a la salud y a los alimentos que los contienen. [14,32,60,91,102]

Sin embargo, además de los efectos benéficos que tienen los compuestos polifenólicos en la salud, estos compuestos también presentan ciertas características indeseables en cuanto a la funcionalidad y el valor nutritivo de las proteínas de origen vegetal, ya que pueden afectar algunas propiedades sensoriales y organolépticas de las frutas y vegetales como el sabor, astringencia, color, etc. Todo esto se debe a que los compuestos fenólicos forman grandes complejos con las proteínas de los alimentos en los sistemas alimentarios por lo que no pueden ser aprovechadas por el organismo. [119]

1.3.3.1.6. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias con estructuras muy variadas (*ver Figura 1.5*) que, en pequeñas concentraciones, tienen la capacidad de inhibir o retardar la velocidad de las reacciones de oxidación de compuestos fácilmente oxidables causadas por la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres⁶. Estos antioxidantes rompen la cadena de la oxidación mediante la donación de un átomo de hidrógeno, estabilizando el radical resultante por la deslocalización de electrones y/o por un enlace intramolecular de hidrógeno u otras oxidaciones posteriores (*ver Figura 1.6*). [108,132,133]

⁶ Átomo, molécula o fragmento de molécula que posee en su orbital externo, un electrón no apareado. Éste "roba" un electrón de otro elemento, el cual, a su vez, actúa como radical libre, con lo que se ocasiona una reacción en cadena.

No	Compuesto	Sustituyente
Bencenos		
1	Catecol	1,2-OH
2	Resorcinol	1,3-OH
3	p-hidroxiquinona	1,4-OH
4	pirogalol	1,2,3-OH
Ácidos benzóicos		
5	Ácido p-hidroxibenzóico	4-OH
6	Ácido vainílico	3-OCH ₃ ,4-OH
7	Ácido siríngico	3,5-OCH ₃ ,4-OH
8	Ácido protocatéquico	3,4-OH
9	Ácido gentísico	2,5-OH
10	Ácido gálico	3,4,5-OH
Ácidos cinámicos		
11	Ácido p-cumárico	4-OH,R=H
12	Ácido ferúlico	3-OCH ₃ ,4-OH,R=H
13	Ácido sinapínico	3,5-OCH ₃ ,4-OH,R=H
14	Ácido caféico	3,4-OH,R=H
15	Ácido clorogénico	3,4-OH,R=Ácido quínico
16	Ácido rosmarínico	
Flavanas		
17	(+)-Catequina	3,5,7,3',4'-OH
18	(-)-epicatequina	3,5,7,3',4'-OH
Flavonoles		
19	Quercetina	3,5,7,3',4'-OH
20	Morina	3,5,7,2',4'-OH
21	Rutina	5,7,3',4'-OH,3-Rutinosa
22	Kaemferol	3,5,7,4'-OH
Flavonas		
23	Crisina	5,7-OH
24	Apigenina	5,7,4'-OH
25	Leutolina	5,7,3',4'-OH
Flavanonas		
26	Naringenina	5,7,4'-OH
27	Hesperetina	5,7,3'-OH,4'-OCH ₃
28	Eriodietiol	5,7,3',4'-OH
29	(+)-taxifolin	3,5,7,3',4'-OH
Isoflavona		
30	Biocanina A	
Tanino		
31	Ácido elágico	
Otros		
32	Curcumina	
No-polifenólicos		
33	Ácido ascórbico	
34	cisteína	

Figura 1.5. Estructura de algunos antioxidantes

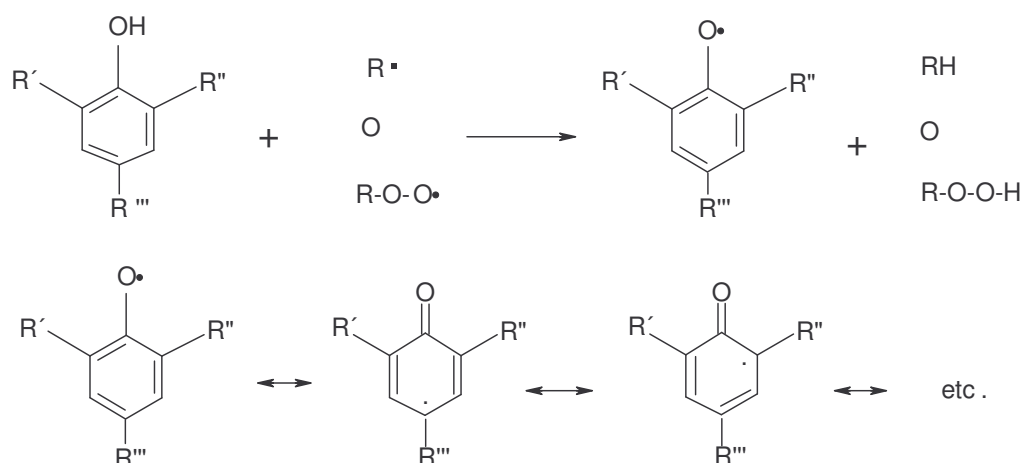


Figura 1.6. Mecanismo de reacción de los antioxidantes.

En diversos estudios, esta habilidad de actuar como potentes antioxidantes, ya ha sido reportada en compuestos fitoquímicos, como los compuestos fenólicos ya que estos compuestos son preferentemente oxidados en comparación con otros constituyentes alimenticios o componentes de tejido y celulares. [48,64,98]

Todas las células de nuestro organismo dependen del oxígeno para liberar la mayor parte de la energía química disponible en los alimentos mediante su oxidación. Sin embargo, el metabolismo normal del oxígeno también conlleva a la inevitable producción de radicales libres que oxidan las sustancias de las células (proteínas, lípidos, material genético y carbohidratos), lo que ocasiona el daño oxidativo y el envejecimiento de nuestro organismo. Por otro lado, este mismo proceso de oxidación lo aprovechan nuestras células para combatir bacterias y otros invasores mediante potentes oxidantes, que ellas mismas elaboran, llevando a cabo diversas reacciones de oxidación (un átomo o grupo de átomos ceden electrones) y de forma simultánea, las correspondientes reacciones de reducción (captación de electrones por otro átomo diferente o grupo de átomos). [37,56,61,63,85]

Sin embargo, nuestras células, al no ser selectivas, provocan un exceso de estas reacciones de oxido-reducción, ocasionando un daño a nivel celular, en donde están involucradas diversas especies reactivas de oxígeno (y nitrógeno). En consecuencia, el organismo se tiene que apoyar de sustancias antioxidantes mediante mecanismos de defensa, a nivel fisiológico y bioquímico; sin embargo, puede no ser suficiente esta respuesta celular, por lo que hay reforzar con antioxidantes provenientes de los alimentos. [26,61,99]

En el caso de los alimentos, los componentes que lo integran pueden sufrir de reacciones de oxidación que deteriorarán su calidad ya que afectan las características sensoriales y vida útil del

producto, por lo que es necesario el empleo de compuestos antioxidantes que retarden el proceso de oxidación durante el procesamiento y almacenamiento de los mismo. Así mismo, los antioxidantes evitarán la alteración sensorial (color, sabor, textura) y nutricional de los alimentos. Para el caso del queso, los procesos más importantes involucrados con la actividad antioxidante y el daño oxidativo son el procesamiento, almacenamiento y maduración. [48,57,69]

1.3.3.1.7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está en función de la estructura química por lo que pueden actuar, de manera directa, como antioxidantes naturales, al inhibir la oxidación lipídica o de otros compuestos; o bien, de manera indirecta, como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir, se unen a estos iones y reducen la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres. [17,98,126]

Así mismo, tanto la composición como la potencialidad de estos antioxidantes naturales depende de varios factores, principalmente, de la variedad del alimento, que estará íntimamente ligado con su estructura química (tipo de compuesto, el número y posición de sus grupos hidroxilos, conjugación y metoxilación); así como el proceso de elaboración del producto, tratamiento, maduración y almacenamiento. Todo esto reflejará la actividad secuestrante sobre los radicales libres (hidroxilo, peroxilo, superperoxido, alcoxilo y oxido de nitrógeno, etc). Por ejemplo, diversos estudios han descrito que las formas glicosiladas presentan una menor actividad antioxidante que sus correspondientes agliconas. [10,53,59]

También se sabe que la propiedad antioxidante de estos compuestos fenólicos funciona mejor a, relativamente bajas concentraciones como agentes reductores, donadores de hidrógeno y supresores del oxígeno singulete; o bien como quelantes potenciales sobre metales. A altas concentraciones son susceptibles a la oxidación porque pueden promover actividad pro-oxidante y estar relacionados en reacciones de iniciación. [9, 56,69,103]

1.3.3.1.7.1. Métodos de evaluación

La actividad antioxidante es un parámetro ampliamente utilizado para caracterizar diferentes extractos biológicos, para ello, primero se tienen que aislar a los antioxidantes mediante métodos de extracción que sean eficientes al emplear disolventes adecuados en función de su polaridad. Así mismo, el tiempo empleado para la extracción de los compuestos de interés. [30,48,118]

Sin embargo, no solo el proceso de extracción influye en la capacidad antioxidante, sino que también interviene la calidad de la materia prima, la zona geográfica, manejo y almacenamiento, factores ambientales y tecnológicos. [49,73]

Es por ello, que el procedimiento de extracción debe ser determinado de acuerdo al tipo de antioxidantes que serán extraídos. Los antioxidantes polares como los ácidos fenólicos y muchos glicósidos son, generalmente, extraídos utilizando agua, alcoholes o mezclas de éstos. En cambio, para los antioxidantes como las agliconas y carotenoides, se emplean disolventes no acuosos. [73,123]

En diversos estudios se ha comprobado, que el metanol es empleado más frecuentemente que el etanol debido a su mayor eficiencia en la extracción. El metanol entre 50-80% ha sido utilizado para extraer ácidos hidroxicinámico y muchos subgrupos de flavonoides. Alta composición de agua en un disolvente puede ayudar en la extracción de glicósidos de estos mismos compuestos. En caso de encontrarse en forma su forma aglicona se puede preceder a una hidrólisis antes o durante el proceso de extracción empleado. [29,121]

Existen muchos modelos de estudio *in vitro* e *in vivo* que han sido desarrollados para la evaluación de la actividad antioxidante. Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos de esos sistemas modelo tienen que analizarse con cuidado debido a que los diferentes métodos están basados en diferentes mecanismos, en consecuencia resulta una variación considerable en las determinaciones de la actividad antioxidante. Es por ello, que hasta el día de hoy, no existe un sistema perfecto que nos permita conocer acerca de la capacidad antioxidante de un compuesto simple o medio complejo de fitoquímicos, por lo que hay que ser cuidadosos con la relación a la naturaleza del ensayo. [60,97]

Para la evaluación de la actividad antioxidante, existen tanto métodos cualitativos, como cuantitativos, algunos se basan en la generación de radicales libres cromóforos para simular especies reactivas de oxígeno, los que son estabilizados por la presencia de un antioxidante. En el primer caso puede efectuarse mediante la técnica de cromatografía en placa y en el segundo, se puede monitorear la reacción de reducción y relacionar la concentración del antioxidante mediante técnicas fotométricas. [9,41,73]

Entre los radicales orgánicos más comúnmente empleados para la evaluación de la eficacia del antioxidante, tanto de compuestos puros como de mezclas, se encuentran los radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Ambos presentan gran estabilidad en ciertas condiciones de ensayo pero también muestran diferencias importantes en su respuesta a los antioxidantes y en su manipulación. [18,70,80]

En la última década, el método más representativo para la evaluación de la actividad antioxidante, es el ensayo que emplea al radical DPPH debido a que es una buena prueba inicial por la rapidez, sensibilidad, excelente estabilidad del radical, reproducibilidad y bajo costo del ensayo. [10,19,54]

Con este método es posible determinar el poder antioxidante al evaluar el decremento de la absorbancia del DPPH a 515-517 nm, la disminución de la absorbancia es resultado de un cambio de color púrpura a amarillo, [18,19,70]

El DPPH es un radical cromóforo que no requiere de ser preparado en el momento, que al reaccionar con un agente donador de electrones (AH), es reducido a su forma DPPH-H, en donde un cambio en el color púrpura (forma oxidada) a amarillo (forma reducida), indica qué tan activo es el antioxidante que se está evaluando, ya que el radical DPPH es secuestrado por el antioxidante, a través de la donación de un hidrógeno o de un electrón para formar una molécula diamagnética estable (*ver Figura 1.7*). Algunas desventajas de este método son que el DPPH únicamente puede ser disuelto en medios orgánicos, especialmente en medios alcohólicos no acuosos, lo que representa una limitación importante del método cuando se miden actividades de antioxidantes de naturaleza hidrofílica, además presenta poca correlación con resultados de otros métodos. [9,60,69]

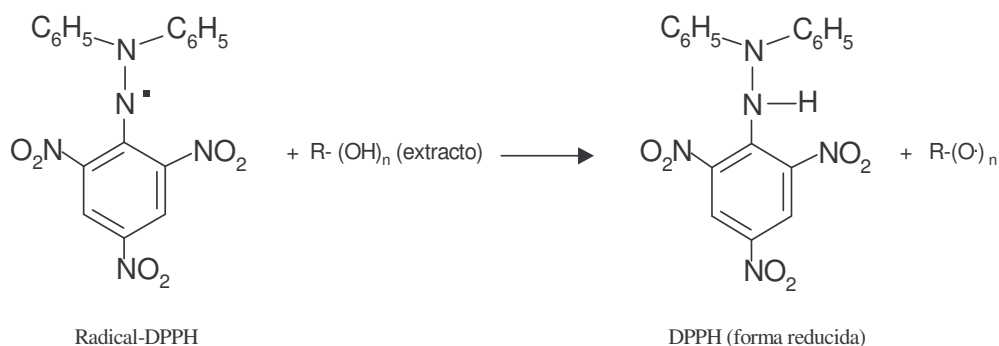


Figura 1.7. Mecanismo de acción del radical DPPH

Similar al ensayo de DPPH, está la reacción entre el radical cromógeno ABTS y el antioxidante que es el donador de electrones (*ver Figura 1.8*). La única diferencia es que, antes de reaccionar con el antioxidante, el radical ABTS debe ser generado por oxidación del ABTS por medio de reacciones químicas utilizando agentes oxidantes como persulfato de potasio o dióxido de manganeso, ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl); o enzimáticamente, empleando enzimas como la peroxidasa. La reacción entre el persulfato de potasio y el ABTS tiene una estequiometría 1:0.5, lo que provoca una oxidación incompleta del ABTS para formar el radical ABTS; esta reacción dura 24 horas. [37,59]

El radical ABTS es soluble en medio orgánico y acuoso, por lo que la actividad antioxidante puede ser medida tanto para compuestos de naturaleza lipofílica o hidrofílica. Su estabilidad es alta. Presenta un espectro de absorción con máximos en las bandas 414 nm, 645, 734 y 815 nm. Debido a que este radical presenta absorción máxima próxima a la región de infrarrojo reduce

posibles interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Funciona de la misma manera que el DPPH solo que el cambio de coloración es de verde/azul (forma oxidada) a amarillo (forma reducida) (ver *Figura 1.9*). [85,129]

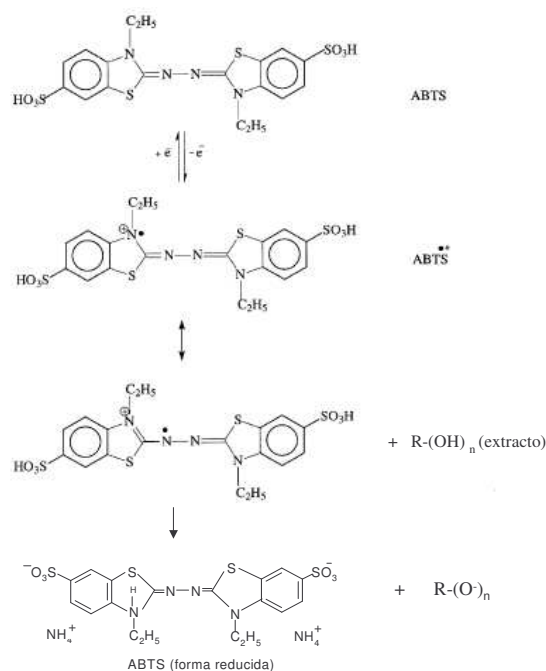


Figura 1.8. Mecanismo de reacción radical ABTS⁺

Sin embargo, es importante mencionar que estos métodos son no específicos, presentan la limitante de no tomar en cuenta los mecanismos complejos de los antioxidantes fenólicos, su comportamiento en sistemas biológicos complejos, fenómenos de partición y el efecto de los sustratos en su efectividad.

Existen otros compuestos cromógenos que pueden ser utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante como son el DMPO (N,N-dimetil-p-fenildiamina dihidrocloruro), que es generado preferentemente con cloruro férrico, mostrando un máximo de absorción a 505 nm. El DMPD no es soluble en agua por lo que no puede usarse para antioxidante hidrofóbicos. Otro método es el ensayo FRAP (ferric reducing/antioxidant power), el cual consiste en medir el poder reductor de un compuesto antioxidante que reducirá el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}). Entre muchos otros entre los que podemos también mencionar al TPTZ ($\text{Fe}^{2+}/2,4,6$ -tripirydil-s-triazine), β -CLAMS (β caroteno-linoleico acid model system), ORAC (Oxygen radical absorption capacity) con diferentes mecanismos. [98,108]

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS

Al conocer algunas características del queso Cotija, además de la relación que podría existir entre este producto y la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos, se puede plantear las siguientes hipótesis:

- ☛ Si el queso Cotija no tiene un proceso estandarizado de elaboración, aunado a la variabilidad de la composición química de la leche empleada para su fabricación, entonces la composición química de los quesos a evaluar presentará diferencias significativas entre si.

- ☛ Si el ganado que produce la leche para la elaboración del queso tiene una alimentación de libre pastoreo, entonces el producto presentará mayor contenido de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante con respecto al obtenido por el ganado estabulado.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

- * Establecer la composición química promedio del queso Cotija Región de Origen para la estandarización del producto.
- * Evaluar la presencia de compuestos polifenólicos, así como su actividad antioxidante en el queso Cotija, la leche con que se produce y el suero que se obtiene como subproducto, para explorar la posibilidad de dar un valor agregado al producto.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- * Analizar estadísticamente la cantidad en que se encuentran los componentes principales de las diferentes muestras de queso.
- * Comparar con la composición proximal de una muestra de queso Cotija de origen desconocido, comercializado en la Cd. de México.
- * Comparar con la composición proximal de una muestra de queso de apariencia similar al Cotija.
- * Comparar otros parámetros como acidez, a_w , pH y contenido de cloruros en todos los quesos a analizar.
- * Evaluar la presencia de compuestos polifenólicos tanto en los quesos como en diversas muestras de leche y suero
- * Evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos tanto en los quesos como la leche y el suero.
- * Relacionar la información sobre el proceso de producción de la investigación de campo con el análisis químico.

CAPÍTULO 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente estudio se realizó en dos partes.

En la primera parte, se determinó la composición proximal y fisicoquímica del queso Cotija Región de Origen, así como de un queso Cotija de origen desconocido y un queso con apariencia similar a este producto. El método empleado en cada una de las determinaciones se muestra en el siguiente diagrama (ver Figura 4.1.)

Primera parte

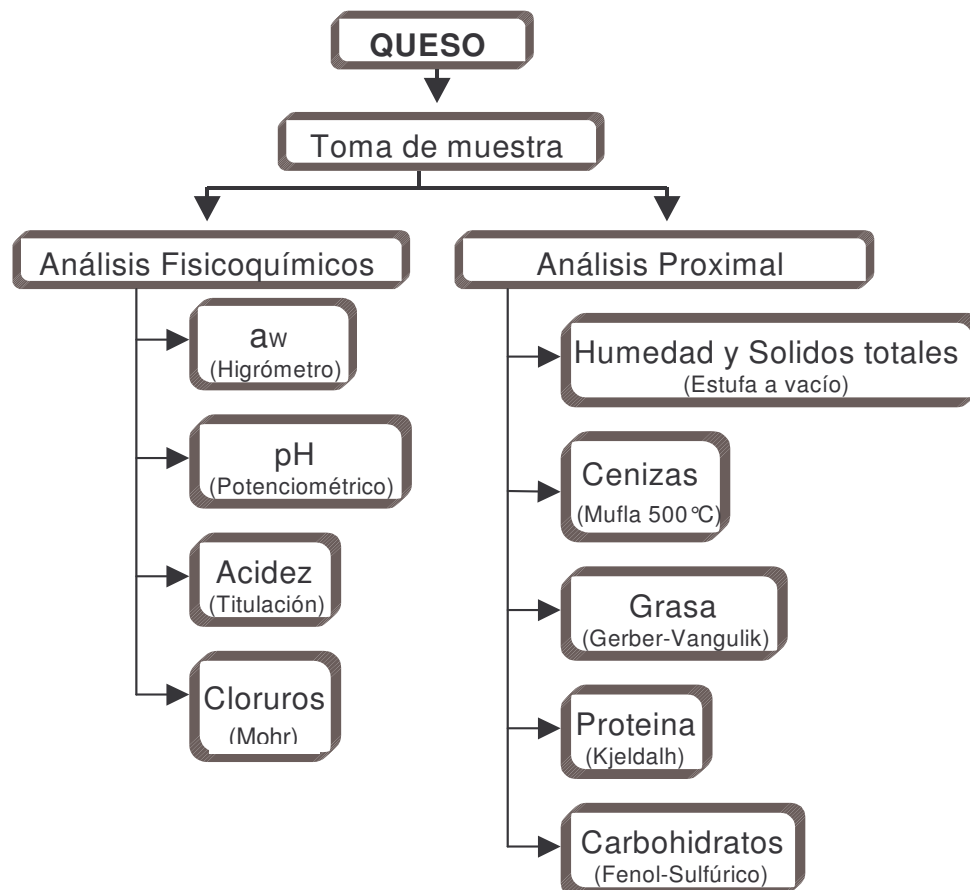


Figura 4.1. Diagrama para la determinación proximal y fisicoquímica

En la segunda parte del estudio, se analizó el contenido de polifenoles totales y su actividad antioxidante en los distintos queso, así como en las diversas leches y lactosueros.

El método empleado en cada una de las determinaciones se muestra en el diagrama siguiente (ver Figura 4.2):

Segunda parte



Figura 4.2. Diagrama para la determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DATOS DE LAS MUESTRAS

Se analizaron 10 muestras de quesos (ver *Tabla 5.1*). De la muestra 1 a la 8 corresponden a los quesos oreados (3-6 meses de maduración) elaborados por miembros de la “Asociación Regional de Productores de Queso Cotija”. La muestra 9 fue un queso Cotija del cual se desconoce el origen y grado de maduración. Finalmente, la muestra 10 fue un queso doble crema con características de apariencia similares al queso Cotija, elaborado en el estado de Chiapas. Las últimas dos muestras se obtuvieron del mercado de San Juan, localizado en la Ciudad de México.

Tabla 5.1. Datos de las muestras de queso

No	ABREV.	TIPO	ORIGEN	ESTADO
1	Q ₁	Cotija oreado	La Troja. Quitupan	Jalisco
2	Q ₂	Cotija oreado	Quitupan	Jalisco
3	T	Cotija oreado	El Rodeo. Tocumbo	Michoacán
4	CP ₁	Cotija oreado	Rancho de Lourdes. Cotija de la Paz	Michoacán
5	Q ₃	Cotija oreado	La mesa del Aguacate. Quitupan	Jalisco
6	SMO	Cotija oreado	La tortuga por Lourdes. Sta. María del Oro	Jalisco
7	CP ₂	Cotija oreado	Rancho de Lourdes. Cotija de la Paz	Michoacán
8	LT	Cotija oreado	La Tinaja	Michoacán
9	SJ	Cotija	Mercado de San Juan	Desconocido
10	P	Doble crema	Pijijipan	Chiapas

Para la segunda parte, además de los quesos mencionados anteriormente, también se analizaron 8 muestras de leche bronca. En la *Tabla 5.2*. se muestran la raza del ganado de la que provenían dichas muestras y su origen, en las que de la muestra 1 a la 3 provenían de ganado alimentado con el sistema de libre pastoreo, pertenecientes al municipio de Santa María del Oro. La muestra 4 provenía de ganado alimentado con el sistema estabulado y de la 5 a la 8 provenían de ganado alimentado con el sistema de libre pastoreo, pertenecientes al municipio de la Tinaja.

Tabla 5.2. Datos de las muestras de leche bronca

No	ABREV.	RAZA	TIPO DE ALIMENTACIÓN	ORIGEN
1	C-SMO	Cebú	Libre pastoreo	Sta. María del Oro
2	H-SMO	Holstein	Libre pastoreo	Sta. María del Oro
3	M-SMO	Mezcla de leches	Libre pastoreo	Sta. María del Oro
4	M-EM	Mezcla de leches	Estabulado	Estado de México
5	CA-LT	Criollo autentico	Libre pastoreo	La Tinaja
6	C-LT	Cebú	Libre pastoreo	La Tinaja
7	H-LT	Holstein	Libre pastoreo	La Tinaja
8	M-LT	Mezcla de leches	Libre pastoreo	La Tinaja

Así mismo, para la segunda parte, se analizaron 2 muestras de lactosuero (ver *Tabla 6.3*). La primera obtenida del municipio de La Tinaja y la segunda del municipio de Sta. María del Oro.

Tabla 5.3. Datos de las muestras del lactosuero

No	ABREV:	ORIGEN
1	SMO _a	Sta. María del Oro
2	LT _b	La Tinaja

5.2. TOMA DE MUESTRA

Todas la muestras se encontraban almacenadas en un ultracongelador a -70°C.

Para la toma de muestra, éstas se descongelaron transfiriendo del ultracongelador a un refrigerador a 4°C.

A los queso se les eliminó cuidadosamente la corteza, con el fin de obtener una muestra homogénea y, posteriormente, se tomaron aproximadamente 100 g de muestra. Se desmenuzó finamente, de manera mecánica, cuidando que la temperatura final no rebasará los 25°C. Finalmente, se guardó en congelación (-20 °C) hasta la realización de las determinaciones.

La toma de muestra tanto de la leche como del lactosuero fue directa es decir, no se realizó una manipulación previa a su utilización aunque se requirió de una agitación para su homogenización.

5.3. ANÁLISIS PROXIMAL

5.3.1. DETERMINACIÓN HUMEDAD Y SÓLIDOS TOTALES

Para la determinación de la humedad se empleó el método de estufa al vacío, el cual es un método gravimétrico que permite la evaporación de la humedad utilizando temperaturas <100°C bajo presión reducida para prevenir la pérdida o descomposición de diversos compuestos hasta su desecación. El procedimiento que se siguió fue la modificación de la NMX-F-83-1986; así como la NMX-F-111.1984 para la determinación paralela de sólidos totales, el cual consistió en utilizar un pesafiltro a peso constante (3 h a 100°C en la estufa, Riossa Ec.) y en él pesar 2.00 g de muestra en una balanza analítica (Voyager OHAUS V10640) distribuyendo uniformemente sobre el pesafiltro. Colocarlo en una estufa a vacío (National Appliance Co, 5831) a 12 Kpa/92°C hasta su desecación (aproximadamente 6 h). Enfriar el pesafiltro dentro de un desecador a temperatura ambiente hasta obtener un peso constante. [7,77,80]

Finalmente, calcular el porcentaje de humedad de la siguiente manera:

$$MS = PM - PF \qquad \%H = \left(1 - \frac{MS}{M}\right) \times 100$$

donde:

PF = Gramos de pesafiltro.
M = Gramos de la muestra
PM = Gramos del pesafiltro + muestra
MS = Muestra seca
%H = Porcentaje de humedad

Para obtener el %Sólidos totales realizar la siguiente operación: $\% S_T = 100 \% - \% H_{muestra}$

5.3.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Se empleó el método gravimétrico en el que la materia orgánica se quema a la temperatura más baja posible y la materia inorgánica remanente se enfría y pesa. Este procedimiento es el estipulado en la NMX-F-701-COFOCALEC-2004, que consistió en pesar un crisol dentro de la mufla a $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Posteriormente, enfriar en un desecador a temperatura ambiente con el fin de obtenerlo a peso constante. Registrar el peso del crisol (C).

Pesar en el crisol 3.00 g de muestra en una balanza analítica (Voyager OHAUS V10640) y colocarlo sobre una placa caliente (Magnetic Stirrer 04803-00) para la eliminación del agua y posteriormente, su carbonización total. Colocar el crisol dentro de una mufla para la calcinación completa a $550 \pm 25^{\circ}\text{C}$ durante 2 h debido a que a temperaturas mayores se producen pérdidas por volatilización (los citratos se descomponen en CO_2) o por interacciones químicas entre los constituyentes (el azufre y el fósforo orgánicos se transforman en sulfatos y fosfatos a partir del azufre y fósforo orgánicos). [5,79,87]

Cuando las cenizas están blancas o ligeramente grisáceas homogéneas, se colocar en un desecador hasta alcanzar su temperatura ambiente. Finalmente, registrar su peso (MC).

Para calcular la cantidad de cenizas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Ce_{BH} = \frac{(MC - C)}{M} \times 100$$

donde:

%Ce_{BH} = Porcentaje de cenizas, base húmeda
 C = Peso del crisol a peso constante
 M = Peso de la muestra
 MC = Gramos de las cenizas + crisol

5.3.3. DETERMINACIÓN DE GRASA BUTÍRICA

Para la determinación de grasa en los quesos, se empleó el método volumétrico de Gerber-Vangulik descrito en la norma mexicana NOM-F-100-1984 que consistió en pesar en un butirómetro Gerber-Vangulik para queso, 3.00 g de la muestra en una balanza analítica (Voyager OHAUS V10640). Agregar por la abertura superior, 15 mL de ácido sulfúrico concentrado ($\bar{d}=1.53$ a 15°C , BAKER) hasta cubrir todo el queso. Tapar la abertura y colocar el butirómetro en un baño de agua con control digital a 65°C (Oaklon Stable Temp.,17501-00) durante 30 minutos. Agitar suavemente para disolver las partículas de queso. Todo esto, con el fin de realizar la digestión parcial de los componentes del queso, exceptuando la grasa. Posteriormente, agregar 1 mL de alcohol isoamílico (grado analítico, SIGMA) para favorecer la ruptura de la emulsión después de disminuir la tensión interfacial entre la grasa y la mezcla en reacción; además de prevenir la sulfonación y carbonización de la misma. Agitar y se agregar ácido sulfúrico hasta

aproximadamente a $\frac{3}{4}$ partes de la columna graduada. Tapar la abertura superior y se colocar el butirómetro en el baño control digital durante 5 min. Mezclar y centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. Incubar, nuevamente, en el baño digital a 65°C durante 10 minutos para facilitar el ascenso de los glóbulos pequeños de grasa. [74,81,87]

La lectura observada en la escala (ajustando a cero, por medio de presión en el tapón del butirómetro) indica, directamente, la cantidad en % de la grasa contenida en el queso.

NOTA: El alcohol isoamílico no afecta los resultados ya que reacciona con el H_2SO_4 formando un éster que es completamente soluble en el ácido

5.3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Se empleó el método de micro-Kjeldahl, ya que la cuantificación de nitrógeno es un buen estimador del contenido de proteína. El procedimiento empleado fue una modificación la norma NMX-F-098-1976, que consistió en pesar 0.20 g de muestra en una balanza analítica (Voyager OHAUS V10640). Colocar en un tubo Kjeldahl junto con una pastilla digestora (sulfato de cobre pentahidratado y sulfato de potasio o sodio anhidro) y 10 mL de H_2SO_4 concentrado concentrado ($\delta=1.53$ a 15°C, BAKER). Someter al tubo a la digestión (Digest-Kjeldahl) con una trampa de succión de gases hasta su digestión completa. Dejar enfriar a temperatura ambiente. En esta parte del procedimiento se consigue la oxidación de las proteínas y compuestos orgánicos por ebullición con H_2SO_4 , en donde, el ácido sulfúrico se transforma a SO_2 y el material nitrogenado a sulfato de amonio. [75,87]

Posteriormente, el tubo Kjeldahl se coloca en un destilador (destilador-Kjeldahl), al que se le dispara NaOH 40% para liberar el amoniaco, el cual se recibe en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de ácido bórico al 4% y 10 gotas de indicador (verde de bromocresol al 0.1%), hasta obtener un volumen aproximado de 100 mL. Finalmente, el nitrógeno amoniacal se titula con HCl 0.1 N y registra el volumen gastado

El porcentaje de proteína se calculó de la siguiente manera:

$$\%N = \left(\frac{(mL_{muestra} - mL_{blanco})_{gastados} \times N_{HCl} \times 0.014}{P_{muestra}} \right) \times 100 \quad \%P = \%N \times 6.38$$

donde:

%N = Porcentaje de nitrógeno en la muestra
 mL_{muestra} = Mililitros gastados para la muestra
 mL_{blanco} = Mililitros gastados para el blanco
 N_{HCL} = Normalidad del ácido clorhídrico
 0.014 = Miliequivalentes del nitrógeno.

donde:

%P = Porcentaje de proteína
 6.38 = Factor de conversión para leche y productos lácteos.

5.3.5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Se empleó el método de Fenol-sulfúrico descrito por Dubois (1956), que consistió en diluir los carbohidratos solubles en agua hasta encontrarse en el intervalo de sensibilidad del método (10-100µg/ml). [34]

Posteriormente, colocar 1 mL de la solución acuosa de la muestra y adicionar 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclar perfectamente e inmediatamente adicionar cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado ($\delta=1.53$ a 15°C, BAKER). Mezclar y dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, medir la absorbancia a 480 nm, en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer).

El porcentaje de carbohidratos presentes en la muestra se calcula a partir de una curva patrón preparada con una solución de glucosa. (ver Anexo D)

5.4. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS

5.4.1. DETERMINACIÓN DE pH

El procedimiento que se siguió fue una modificación a lo descrito en la NMX-F-099-1970. Este procedimiento consistió en pesar 9.00 g de muestra en una balanza analítica (Voyager OHAUS V10640) y colocar en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Llevar a 100 mL de H₂O destilada pH=7, temperatura ambiente. Posteriormente, someter a agitación (200 rpm, 15 min, T=30°C) en una incubadora (Labtine Instruments INC., Shakerbath). Filtrar en un vaso de precipitados de 250 mL con ayuda de gasa, hasta obtener una solución sin grumos, ni glóbulos grasos. [76,87]

El potencial se mide directamente en términos de pH en la escala de un potenciómetro calibrado (Beckamn. Maclem. Modelo 34 pH) mediante el empleo de un electrodo de vidrio en combinación con un electrodo de referencia de calomel en agitación continua (Magnetic Stirrer 4802-00).

5.4.2. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ

Se realizó de acuerdo a una modificación de la NMX-F-206-1986. Este procedimiento consistió en partir del filtrado obtenido en el procedimiento anterior. Tomar una alícuota de 25 mL con pipeta volumétrica. Posteriormente, colocar en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y adicionar 0.5 mL de fenolftaleína 1%. Finalmente, titular con NaOH 0.1N. con agitación continua (Magnetic Stirrer, 4802-00) hasta obtener el vire rosa claro (persistente por 30 segundos). [74,78]

El resultado se expresa como % ácido láctico obtenido de la siguiente manera:

$$\% \text{ Ácido Láctico} = \left(\frac{mL \text{ NaOH}_{\text{gastados}} \times N_{\text{NaOH}} \times 0.09 \text{ meq}}{\chi \text{ g}_{\text{muestra}}} \right) \times 100$$

Donde:

N = Concentración de la NaOH
0.09= Miliequivalentes de ácido láctico
 χ = Cantidad de muestra empleada

5.4.3. DETERMINACIÓN DE CLORUROS

El procedimiento empleado fue una modificación del método de Mohr, en el que se verificó que este método funcionará para una matriz compleja como la del queso, por lo que se adquirió una cuajada sin sal, a la que se le agregó una cantidad conocida de NaCl. El procedimiento consistió en pesar 10.00 g en una balanza analítica (Voyager OHAUS V10640) sobre un matraz Erlenmeyer de 250 mL. agregar 15 mL de agua caliente (T=50°C). Posteriormente, adicionar 25 mL más de agua. Colocar el matraz en una incubadora (New Brunswick 4000) a 200 rpm a T=50°C para extraer el materia soluble. Decantar y realizar lavados del sólido hasta aproximadamente 100 mL, posteriormente filtrar a vacío con papel filtro (Whatman N.1) y ajustar el sobrenadante a pH=7. Tomar una alícuota de 20 mL y adicionar 1 mL de K₂CrO₄ al 10%. Finalmente, titular con agitación constante (Cole- Parner. Chicago, 60648) con una solución de nitrato de plata (AgNO₃, SIGMA), 0.1 N hasta la coloración rojo-ladrillo (estable por 20 s). [7,24,88]

Nota: El cloruro de plata es precipitado cuantitativamente antes de que el cromato de plata rojo se haya formado (Ver Figura 5.1)

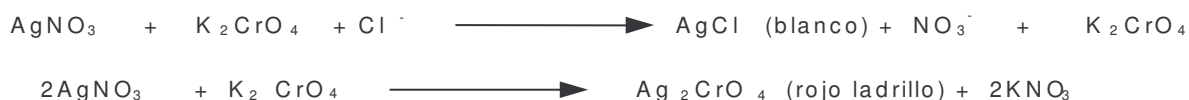


Figura 5.1. Formación del cromato de plata

Paralelamente, se realizó un blanco, para verificar que el agua que se utilizó estuviera libre de halógenos (no mayor a 0.2-0.3 mL de AgNO₃)

Al obtener los datos esperados, se prosiguió a determinar la concentración de cloruros en las muestras de estudio mediante el mismo procedimiento.

El cálculo empleado para determinar la concentración de NaCl fue:

$$\% \text{NaCl} = \left(\frac{(x - y)_{\text{AgNO}_3} \times N_{\text{AgNO}_3} \times 0.0585}{\left(\frac{M \times A}{A_f} \right)} \right) \times 100$$

Donde:

x = mL de solución de AgNO₃ gastados para la muestra
 y = mL de solución de AgNO₃ gastados para el blanco
 N = Normalidad del AgNO₃.
 0.0585 = Miliequivalente correspondientes NaCl.
 M = Peso en gramos de la muestra
 A = Alícuota utilizada en ml.
 Af = Aforo en mL

5.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUOSA

Se determinó de acuerdo al procedimiento descrito en el manual del equipo Rotronic Instrument Corp., AwQuick que consistía en tomar muestra suficiente para cubrir la superficie de una placa y colocarla en el sensor (AwVC) del equipo hasta obtener una lectura estable.

En esta determinación es importante que la muestra presente tamaños de partícula pequeños y homogéneos.

Los resultados obtenidos en esta determinación fueron comparados con los valores teóricos de a_w mediante la ecuación (ver Sección 1.1.4):

$$a_w = 0.997 - 0.604 * X_{NaCl} \quad \text{Donde } X_{NaCl} = \text{kg}_{NaCl} / \text{kg}_{\text{agua}}$$

5.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.5.1. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

El procedimiento empleado para la extracción de los compuestos polifenólicos fue una modificación del procedimiento descrito por Bocco, A. (1998) y Saura, F. (1998) que consistió en pesar 10.00 g de muestra previamente liofilizada (liofilizadora LABCONCO), en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agregar 40 mL de metanol/agua (50:50 v/v). Someter el matraz a 200 rpm, durante 1 hora a temperatura ambiente en una agitadora (Lab-line Instruments Inc.). Transcurrido este tiempo, centrifugar a 2500xg por 15 minutos (Beckman J2-MC). El material residual se somete a una extracción sucesiva con 40 mL de Acetona/agua (70:30) a 200 rpm, 1 hora, temperatura ambiente y, posteriormente, centrifugar a 2500xg por 15 minutos. Los sobrenadantes se juntan y la mezcla obtenida se filtra sobre papel filtro (Whatman No 42). Concentrar en un rotavapor (Büchi R-205 V800) a 40 °C, 120 rpm y una bomba de alto vacío para eliminar el agua residual. Finalmente, sredisolver en 10 mL en etanol absoluto (reactivo analítico) y la fracción que no se solubilice en etanol sredisolver en 10 mL de agua destilada. [16,106]

Los extractos fueron conservados en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

5.5.2. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

La concentración de polifenoles (PF), se determinó por el método de Folin-Ciocalteu^a descrito por Goli, A. (2005) y Liu X. (2006). Este método consistió en tomar 2 mL de la solución del extracto tanto acuoso como etanólico y llevar a un volumen de 5 mL con HCl al 0.3% (v/v). Posteriormente, tomar una alícuota de 100 µL de la solución resultante y adicionar en 2 mL de NaCO₃ al 2% (p/v). Después de 2 min agregar 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma & Aldrich) diluido en agua (1:1). Transcurridos 30 min, medir la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, C618-0432). Esto es posible, debido a que el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácidos fosfowolfrámico y Fosfomolibdato en un medio altamente alcalino) se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃) que presenta absorbancia a dicha longitud. [48,62]

^a Método no es específico que presenta ciertas interferencias por algunos aminoácidos y sustancias reductoras como vitaminas.

Para calcular la concentración de compuestos polifenólicos fue necesario realizar una curva patrón utilizando ácido gálico^b (AG) como estándar (*ver Anexo C*).

5.5.3. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la evaluación cualitativa de los antioxidante presentes en los extractos etanólicos y acuosos se realizó de acuerdo a lo descrito por Forgacs & Cserhati (2002). En este procedimiento se empleó la cromatografía en capa fina en gel de sílice (Alugram Sil G/UV₂₅₄) con un espesor de 0.2 mm. El sistema consistió en una fase móvil de acetato de etilo/ácido fórmico/agua (8:1:1), utilizando una solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, Sigma Aldrich) al 0.2% como agente revelador. La aparición de una coloración amarilla en el fondo púrpura indica una prueba positiva. [41]

Después del secado de las cromatoplasmas, las bandas fueron observadas en una lámpara de UV a 254 y 365 nm.

La capacidad secuestrante de los extractos se comparó con diferentes estándares: Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, análogo soluble en agua y derivado carboxílico del α -tocoferol), BHT, BHQ y TBHQ (Sigma Aldrich Chemical Co.) debido a su capacidad antioxidante. [37,94].

5.5.4. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.5.4.1. CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL DPPH

Para determinar la capacidad secuestrante de los extractos se siguió el procedimiento descrito por Chidambara, K., et al. (2002) que consistió en tomar 2 mL de una solución metanólica de DPPH (Sigma Aldrich Chemical) a 3.6×10^{-5} M y se agregar 50 μ L de extracto (200 ppm). Se monitoreó el decremento la absorbancia a 517 nm durante 20 minutos en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, C618-0432) a temperatura ambiente. El efecto secuestrante se graficó en función del tiempo. [29]

La capacidad secuestrante se comparó con la capacidad secuestrante del Trolox (Aldrich Chemical Co)

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH se calculó de la siguiente manera:

$$\%CS_{DPPH} = \frac{A_{517t=0} - A_{517t_{final}}}{A_{517t=0}} \times 100$$

^b El ácido gálico como sus esteres son derivados hidroxibenzoicos usados como un aditivo antioxidante empleado tanto en la Industria alimentaria como farmacéutica ; además se conoce protección contra el daño oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno.

5.5.4.2. CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL ABTS

Para determinar la capacidad secuestrante de los extractos se siguió el procedimiento descrito por Kuskoski (2005) y Turkmen (2006), que consistió en producir el radical ABTS mediante la solución de ABTS (ácido 2,2'-azinoobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, sal diamónica, Sigma Aldrich) 7 mM con persulfato de potasio (Sigma Aldrich, grado analítico) 2.45 mM (concentración final). Se mezcló y se incubó en oscuridad 12-16 h a temperatura ambiente. Una vez formado el radical se diluyó con etanol hasta una obtener un valor de absorbancia de 0.70 a 734 nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, C618-0432). Posteriormente, se tomaron 10 μ L del extracto de la muestra (200 ppm) y se le adicionó 1 mL de la solución diluida del ABTS⁺. Se monitoreó el efecto secuestrante durante 20 min. [60,123]

La capacidad secuestrante se comparó con la del Trolox (Aldrich Chemical Co.)

El porcentaje de la capacidad secuestrante a 734 nm se calculó de la siguiente manera:

$$\%CS_{ABTS} = \frac{A_{734t=0} - A_{734t_{final}}}{A_{734t=0}} \times 100$$

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se calculó la media de las replicas realizadas; así como la desviación estándar y el coeficiente de variación de todas las determinaciones.

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Stat Graphics Plus 5.1 con $p \leq 0.05$. Este programa realizó el análisis de varianza (ANOVA) de cada una de las determinaciones y posteriormente, aplicó de un análisis de rangos múltiples. [40,60]

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

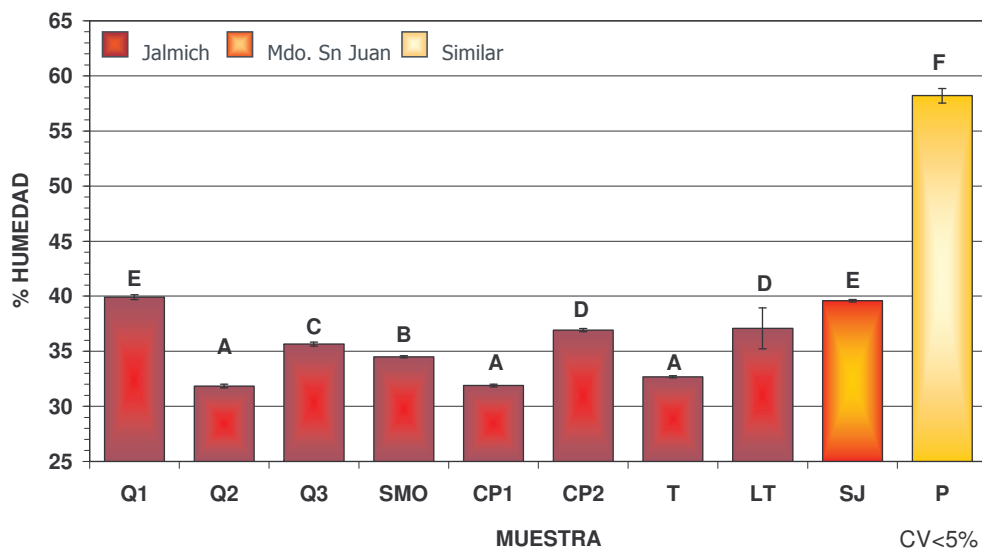
PRIMERA PARTE

6.1. ANÁLISIS PROXIMAL

6.1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y SÓLIDOS TOTALES

Para la obtención de estos resultados, es necesario aclarar que no se determinaron por Termobalanza (método recomendado por la AOAC) debido a los problemas que se presentaban, por ejemplo, un tiempo largo para la obtención de éstos, proyección de la muestra y/o fundido antes de obtener un valor de humedad constante, por estos dos últimos no se lograba obtener una reproducibilidad en los resultados. Por ello, se utilizó el método de secado en estufa al vacío. [43]

En la *Grafica 6.1* se observa que las muestras de queso Cotija que cuentan con la marca colectiva (Jalmich) presentan una humedad entre **32** y **40%** con diferencias significativas entre algunas de las muestras, por ejemplo Q₁, Q₂ y SMO. Estas diferencias pueden deberse al proceso de elaboración de cada uno de los quesos., por ejemplo, en la operación de cortado, las personas pueden realizar el corte de distinta manera ya sea en diferentes formas o cuadros de diversos tamaños. Por ello se recomienda a los productores realizar el mismo tipo de corte y así homogeneizar esta operación, una posibilidad sería cortar la cuajada en cuadros de 1 cm po lado, por tratarse de un queso de pasta dura.



Gráfica 6.1. Contenido de humedad de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
A,B,C,D,E, y F Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Otra operación que puede provocar estas diferencias es la etapa de desuerado debido a los diferentes tiempos en el que se efectúa, lo que causa una pérdida distinta en la cantidad de suero.

Por lo que se recomienda a los productores establecer un tiempo promedio que todos los miembros de la asociación cumplan, por ejemplo 1 h de desuerado.

Sin embargo, la etapa que más marcaría estas diferencias sería el prensado, ya que los productores no tienen establecido el peso de las piedras, ni el tiempo en el que se lleva a cabo esta operación. Por lo cual, sería importante que todos ellos emplearían el mismo peso o que utilizaran una prensa para ejercer la misma presión, por ejemplo 70 Kg por 24 h.

Adicionalmente, el queso se deja madurar a temperatura y humedad del ambiente (sin control en ninguno de los parámetros) por lo que la pérdida de humedad durante la maduración y/o el almacenamiento podría ser variable. Para esto, se recomienda que los productores se organicen para tener un lugar de “acopio” donde se puedan madurar y almacenar todos los quesos elaborados por los miembros de la asociación y así, eliminar esta variante.

En un análisis más detallado, se puede observar que muestras como Q₂, CP₁, y T no presentaron diferencias significativas entre sí, lo cual puede deberse a que durante su elaboración se realizaron operaciones similares como en el cortado (tamaño y/o forma del corte), el tiempo de desuerado; o bien, en el prensado (presión ejercida y/o tiempo). Así mismo, estas muestras fueron las que presentaron el menor contenido de humedad (31.8, 31.9 y 32.7%, respectivamente), lo que podría traducirse en una menor probabilidad de contaminación microbiana y, por consiguiente, una mayor vida de anaquel. Es importante mencionar que desde el punto de vista sensorial, un panel entrenado de un estudio en paralelo, no percibió estas diferencias. [124]

Las muestras LT y CP₂, tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, probablemente, por las mismas razones que en el caso anterior.

En contraparte, tenemos a la muestra Q₁ con el mayor contenido de humedad (39.9%) entre los quesos Cotija auténticos, característica que coincidió con el estudio sensorial, en el que el panel percibió a este queso como el más húmedo y más brillante [124]. Este queso no presentó diferencia significativa con el queso Cotija del mercado de San Juan (39.6%), por lo que probablemente presenten una apariencia similar. Además, esta humedad podría hacer a ambos productos más susceptibles a contaminación microbiana que los demás quesos de la región de Jalisco, con los que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Otros quesos que mostraron diferencias significativas con el resto de las muestras evaluadas fueron Q₃ (35.6%) y SMO (34.5%) pero a diferencia de los anteriores, éstos se encontraban dentro del intervalo de humedad (32-40%) por lo que presentarían características intermedias entre todos los quesos de la Región de Origen. Incluso el panel entrenado no percibió diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar estos resultados con lo establecido en las Reglas de Uso empleadas por los productores de la región de Jalmich para el queso Cotija (máx. 36% humedad), se puede decir que todos los quesos cumplen con este parámetro, a excepción de la muestra SJ y Q₁.

Finalmente, se observa que el queso doble crema (P) presentó el mayor contenido de humedad (58.2% humedad), además de ser estadísticamente diferente de todas las muestras analizadas. Por lo que se puede decir que este queso presentará una menor vida de anaquel en comparación con el resto de las muestras, además de presentar características sensoriales diferentes. Esto último se corroboró con la evaluación sensorial donde se concluyó que la apariencia era más brillante y su textura más suave que la de los queso Cotija auténticos [124].

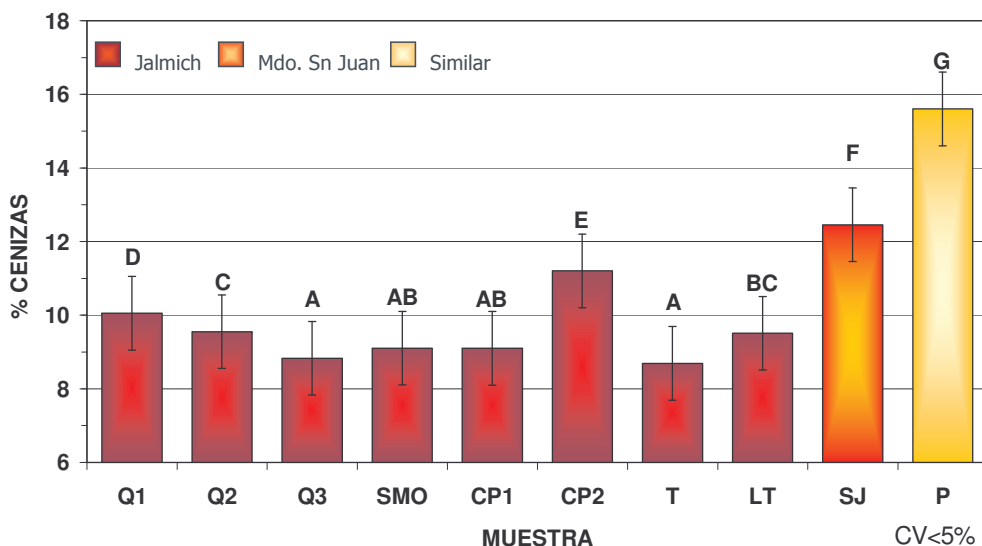
Finalmente, con estos resultados se puede calcular el contenido de sólidos totales en las muestras. Éstos son importantes por que nos dan una idea generalizada de la cantidad de grasa y proteína presente en las muestras debido a que son los principales macrocomponentes de la leche que son concentrados en el queso. Además nos permiten expresar el contenido de los demás componentes del queso en una base homogénea. Para el caso de los quesos Cotija Región de Origen presentaron un intervalo de **60** a **68%** de sólidos totales. Este contenido también se puede encontrar en diversos quesos como: Emmental (64.5%), Gruyère (66.5%), Cheddar (62 %), Brick (60%), Cheshire (66.7%), Manchego (62.1-65.7%), Pedroches (64.75%) y, muy cercanamente, el Gouda (59%), Roquefort (60%) y Parmesano (69%), este último de gran importancia debido a que el queso Cotija también es conocido como el queso Parmesano mexicano. [42,84,91,104]

6.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Es importante mencionar que dentro de los minerales que estamos determinando se encuentran los provenientes de la leche que se encuentran en forma coloidal asociadas a las micelas de las caseínas, como los fosfatos; y el calcio y magnesio de los citratos, así como muchos otros oligoelementos que se encuentran en otras combinaciones orgánicas; sin embargo, en este tipo de quesos, el NaCl que se agrega durante la etapa de salado contribuye en una concentración considerable, incluso podría ser componente principal de las cenizas. [5,109,127]

En la *Gráfica 6.2*, se observa que el intervalo en el contenido de cenizas del queso Cotija Región de Origen es entre **8.7** y **11.2%** expresado en base seca, mostrando diferencias significativas entre algunas de las muestras; aunque para el caso de las muestras T, SMO, CP₁ y Q₃ no se presentaron diferencias estadísticamente diferentes entre sí, al igual que las muestras Q₂ y LT.

También se puede observar que la muestra T es la que contuvo menor contenido de cenizas (8.7%); en tanto que la muestra CP₂ es la que presentó el mayor contenido (11.2%).



Gráfica 6.2. Contenido de cenizas BS de los quesos de Jalmich, San Juan y Chiapas
 A,B,C,D,E, F y G Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Es importante destacar que en las Reglas de Uso, no se consideran a las cenizas como un parámetro para establecer la composición del queso Cotija Región de Origen, por lo que se sugiere que incluyan a este componente para caracterizar de manera adecuada al producto ya que las cenizas pueden influir en la textura que presenta el queso Cotija; por ejemplo, al no agregársele CaCl_2 , contendrá una concentración baja de calcio en comparación con otros quesos, lo que provocará un producto con mayor tendencia a desmoronarse.[5]

Al comparar el contenido de cenizas de los quesos Cotija auténticos con los quesos con contenido de humedad similar, tenemos que el queso Pedroches presenta un porcentaje de cenizas similar (8.22%), al igual que el Blanco (11%) y el Roquefort (10%). En cambio, el queso Emmental (5.4%), Gruyère (6.2%), Cheddar (6.5 %), Brick (7.3%), Cheshire (2.6%), Manchego (5.8%), Gouda (5.0%) e incluso al Parmesano (7.8%), presentan un menor contenido de cenizas. [42,84,91,107]

Por otro lado, tanto la muestra del mercado de San Juan (SJ), como la de Pijijipan (P) presentaron diferencias estadísticamente significativas con el resto de las muestras evaluadas, al presentar el mayor contenido de cenizas (12.5 y 15.6 %, respectivamente).

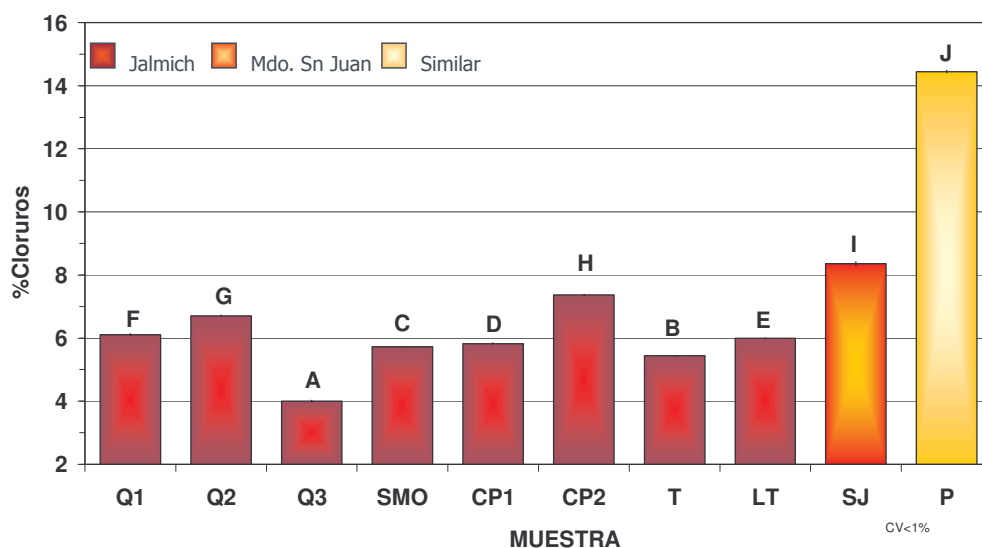
6.1.3. DETERMINACIÓN DE CLORUROS

Como ya se ha mencionado anteriormente dentro de la cantidad de cenizas se encuentra el contenido de cloruros, parámetro importante que afecta la calidad y aceptabilidad del queso, provenientes principalmente de la sal. Un porcentaje alto de NaCl favorece la conservación del producto pues es un factor que controla el tipo y número de microorganismos que pudieran estar presentes en el producto ya que contribuye al decremento de la actividad acuosa. Este efecto se

da por que la sal incrementa la presión osmótica de la fase acuosa de los alimentos, lo que causa deshidratación de células bacterianas y/o su muerte, por lo que la cantidad disminuye (incluyendo patógenos y microorganismos de descomposición de alimentos); además inhibe la actividad de varias enzimas en el queso, como proteasas, lipasas, etc., y por lo tanto, incrementa la seguridad del producto final. [11,25,71]

Así mismo, es importante resaltar que el alto contenido de NaCl ayuda a la sinéresis de la cuajada del queso, se elimina el suero y por lo tanto, se reduce la humedad, lo que influye en la textura, la solubilidad de las proteínas y probablemente, su conformación. Aunque también estas altas concentraciones de sal pueden llegar a presentar efectos negativos desde el punto de vista sensorial (afecta el sabor) y nutricionalmente (provocar hipertensión y riesgos de osteoporosis, que se incrementa por la expulsión de calcio debido a la alta concentración de sodio). [42]

En la *Gráfica 6.3.*, se observa que el mineral predominante en este tipo de quesos es el NaCl, pues representa desde el 45 al 70% del total de cenizas para el queso Cotija y el 92% para la muestra P (*ver Sección 6.1.2*), por lo que el resto de minerales provendrán, principalmente de la leche.



Gráfica 6.3. Contenido de cloruros BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
 A,B,C,D,E, F,G,H, I y J Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Con respecto a las muestras de la “Asociación Regional de productores de Queso Cotija” se observa que el contenido de sal se encuentra dentro del intervalo **4-7.4%** NaCl, con diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras. Esto se debe a que, como ya se mencionó en la *Sección 1.2.4*, la cantidad de sal agregada por cada productor es variable y depende del gusto, costumbres, experiencia, etc., de cada uno de ellos; por lo que se recomienda a los miembros de la asociación estandarizar la cantidad de sal agregada en el queso (138-140 g por cada 20 L de leche) para mantener una calidad constante.

También se puede observar que la alta concertación de sal encontrada en los queso Cotija se ve reflejada en altos contenidos de grasa y proteína (*ver Sección 6.1.5 y 6.1.6*), este efecto se debe a que a mayor concentración de sal, existe una mayor expulsión de agua (menor humedad); por lo tanto un mayor contenido de sólidos totales que se componen principalmente por estos dos macro-componentes.

Al comparar esta concentración con otros quesos, se afirma que el Cotija es uno de los más salados que tiene similitud con quesos como el Asiago (5%), Bulgarian blanco (5.1%) Caciocavallo Siciliano (5.6%), Camembert (5.3 %), Feta (5.4%), Provolone (5.2%), queso Blanco (6%), Romano (7.1%) y Roquefort (5.8%), entre otros. [42]

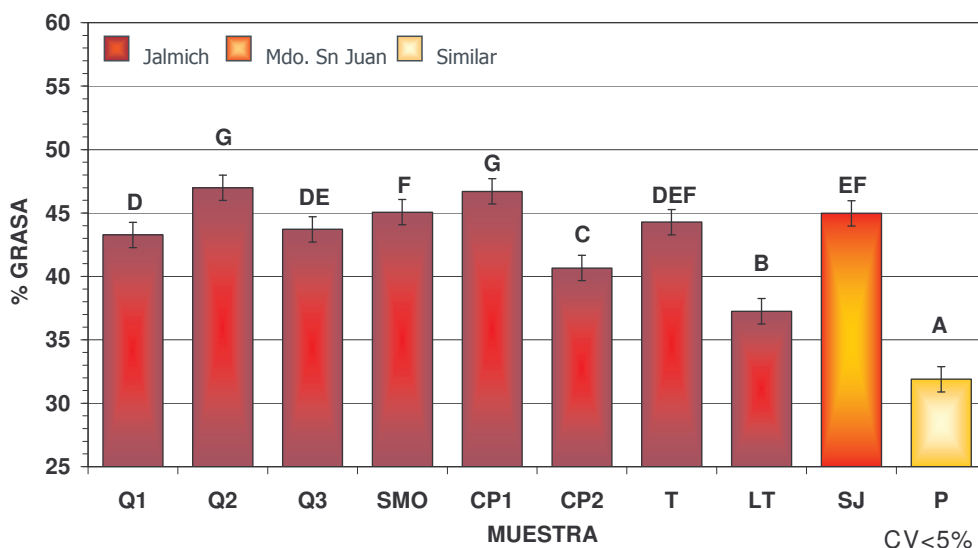
También es importante mencionar que la muestra del mercado de San Juan (SJ), es la que presentó el valor más elevado de cloruros (8.36%) en comparación con los otros quesos Cotija y fue estadísticamente diferente a todas las demás muestras. Este contenido de NaCl podría ayudar al queso a reducir el riesgo de contaminación microbiana, así como brindarle un sabor más marcado y salado.

Un dato interesante es el caso del queso doble crema de Pijijipan (P), pues, como se estudió en el *Sección 6.1.1*, fue la muestra con el mayor contenido de humedad pero fue la que presentó el mayor contenido de NaCl (14.45% cloruros), lo que probablemente ayude a su conservación a pesar de su alto valor en humedad. Por todo ello, una vez más se comprueba que se trata de un queso totalmente diferente al Cotija, aunque en apariencia fueran similares.

6.1.4. DETERMINACIÓN DE GRASA BUTÍRICA

En la *Gráfica 6.4*, podemos observar que existen diferencias significativas en el contenido de grasa, expresada en base seca, entre las muestras de queso evaluadas. Este efecto no se presentó en todos los casos, las muestras Q₁, Q₃ y T no presentaron diferencias significativas entre sí; así como entre las muestras SMO, T y SJ y las muestras CP₁ y Q₂.

También se observa que la muestra LT es la que presentó menor contenido (37.3%) en comparación con las muestras de queso Cotija de la región de Jalisco. En cambio, las muestras CP₁ y Q₂ son las que presentaron el mayor contenido de grasa (46.70 y 47%, respectivamente), lo cual podría traducirse en características sensoriales como mayor adhesividad y sensación grasa con respecto a las demás muestras de queso Cotija auténtico, hecho que fue corroborado instrumentalmente en el estudio en paralelo. Sin embargo, estas diferencias no se lograron identificar sensorialmente, probablemente porque la grasa butírica presente es de bajo punto de fusión, lo que no deja la sensación grasa esperada a pesar de estar presente en alta concentración. [125]



Gráfica 6.4. Contenido de grasa BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
 A,B,C,D,E, F y G Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Así mismo se observar que, las muestras de queso Cotija de la región de Jalmich se encuentran dentro de un intervalo entre 37.3 y 46.2% de grasa. Este amplio intervalo indica que la leche utilizada para la producción del queso tiene una composición variable, lo que se ve reflejado en el producto final.

Una opción para tratar de controlar esta variable podría ser, en primera instancia, que los productores manejaran el mismo tipo de raza del ganado, situación que se lograría a largo plazo. Aunque no hay que olvidar que estos resultados están relacionados al tipo de alimentación del ganado factor que no es posible controlar debido a que son animales de libre pastoreo, pero que sí está minimizado ya que el ganado pastorea en un área delimitada (*ver Sección 1.2.1*). Otros factores, igualmente importantes que afectan el contenido de grasa presente en el producto son la edad del animal, el periodo de lactancia y la frecuencia de la ordeña (*ver Sección 1.1.5*) aunque también podrían ser controlados.

Debido, a lo expuesto anteriormente, se podría solo establecer un mínimo con respecto a la cantidad de grasa de **37%**, expresada en base seca (o 24% base húmeda (BH)). Al comparar este valor con respecto al contenido de grasa establecido en las Reglas de Uso (mín. 23% BH), se observa que todas las muestras de queso Cotija Región de Origen cumplen con este contenido.

Es importante recordar que este alto contenido influirá en las características particulares del producto final debido a que la grasa es considerada como disolvente de compuestos volátiles; además de intervenir en el color del producto final. Así mismo, el contenido de grasa influirá en la conservación del queso, sabor, aroma, consistencia, adhesividad, etc. Sin olvidar el impacto nutricional por la amplia gama de ácidos grasos. [23]

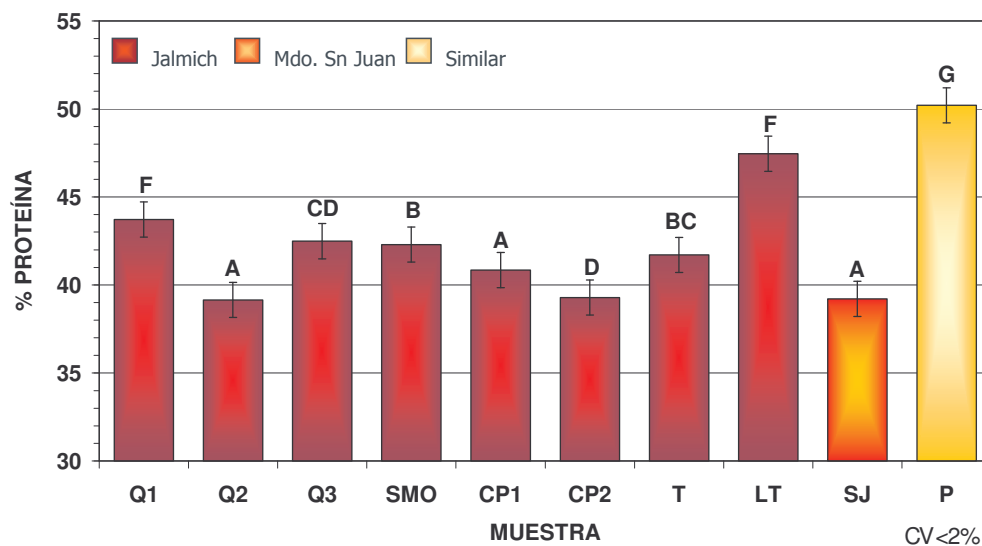
Al realizar, nuevamente, la comparación con otros tipos de queso, se tiene que el Cotija presenta un contenido de grasa similar a quesos como: Gruyère (45%), Manchego (41.7-56%) y cercanamente, el Parmesano (37%). En mayor cantidad, tenemos al queso Cheddar (32-50%), Brick (50%), Cheshire (49.5%), Gouda (48%), Emmental (47.3%) y Hamulli (40.8%), por lo que el queso Cotija Región de origen diferirá en características sensoriales con estos últimos. [42,71,91]

Por otro lado, se puede observar que la muestra del mercado de San Juan (SJ) no presentó diferencia significativas con la muestra T, Q₃ y SMO, lo cual podría significar que la composición de la leche con la que se elaboraron estos quesos fue similar desde el punto de vista graso.

En cuanto a la muestra de queso de Chiapas (P), es interesante que, a pesar de ser “doble crema”, ni siquiera alcance el contenido de grasa más bajo encontrado en las muestras de queso Cotija (31.9%), aspecto que se reflejará en las características sensoriales como en el color y el sabor (menor intensidad de amarillo y aroma más ligero), así como una menor sensación grasa. Estos resultados fueron confirmados en el panel del estudio sensorial. [125]

6.1.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Al observar la *Gráfica 6.5*. podemos darnos cuenta de que no existieron diferencias significativas entre algunas de las muestras como entre Q₂, SJ y CP₁; SMO y T, o bien, entre CP₂ y Q₃. Al no reflejar diferencias significativas entre estas muestras podemos decir que, la cantidad de proteína presente en la leche empleada para la elaboración de estos quesos era similar.



Gráfica 6.5. Contenido de proteína BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
A,B,C,D,E, F y G Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Así mismo, se observa que el intervalo en el que se encuentran las muestras de queso Cotija Región de Origen es de **39.1** a **47.5%**, contenido que se puede comparar con el del queso Gruyère (45.1%), Manchego (40.6%), Cheddar (42%), Brick (37.5%), Cheshire (40%), Gouda

(44.9%), Emmental (42.6%), Hamulli (39.55%) y Pedroches (40.8%); y en mayor cantidad tenemos al queso Parmesano (54.2%). [42,71,84,104,107]

Es importante mencionar que al igual que en la grasa, la cantidad de proteína nos indica la variabilidad de la composición de la leche empleada para la elaboración de este queso, influenciada principalmente, por el tipo de alimentación al cual es sometido el ganado, la raza, etc. (ver Sección 1.1.5), por ello, se propone un mínimo de **39%** de proteína, expresado en base seca (o 27% BH) para el caso de los quesos Cotija Región de Origen por lo que nuevamente, todas las muestras de queso Cotija auténtico cumplen con el contenido mínimo de proteína establecido en las Reglas de Uso (mín. 25% BH)

Este alto contenido de proteína provee un alto valor nutrimental del producto ya que proporcionará elementos esenciales (aminoácidos) para una adecuada alimentación. Además este macrocomponente juega un papel importante en las características del producto final como son: aroma, sabor y consistencia.

Para el caso del queso del mercado de San Juan, se observa que no presentó diferencias significativas con algunos de los quesos Cotija de la región de Jalisco como son el Q₂ y CP₁ (39.2, 39.1 y 39.3%, respectivamente) que tienen el menor contenido de proteína con respecto a las demás muestras analizadas, lo cual era de esperarse ya que si recordamos su relación con el contenido de grasa, eran las que presentaban mayor contenido de ésta y, por consiguiente, menor contenido de proteína. Si observamos estas similitudes, tanto en el contenido de grasa y de proteína, podríamos suponer que este queso podría haber sido elaborado por alguno de los productores auténticos.

Por otro lado, se puede observar que la muestra de Pijijipan, contenía un gran contenido de proteína (50.2%) lo cual era de esperarse ya que presentaba el menor contenido de grasa. Además, fue estadísticamente diferente a todas las demás muestras analizadas, por lo que sus características sensoriales serían diferentes al queso Cotija.

6.1.6. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Es importante mencionar que aún cuando la determinación de carbohidratos parece estar de más para quesos madurados debido a que la mayor parte de la lactosa se pierde durante el desuerado y el remanente, prácticamente desaparece durante los primeros días de la fermentación láctica porque los microorganismos la utilizan para la producción de ácido láctico, su conocimiento sirve para darnos una idea generalizada del proceso, aunque hay que recordar que éste puede variar de acuerdo al contenido de humedad y sal, así como con la temperatura, los cuales determinan el tipo de microorganismos presentes. [5,93,104]

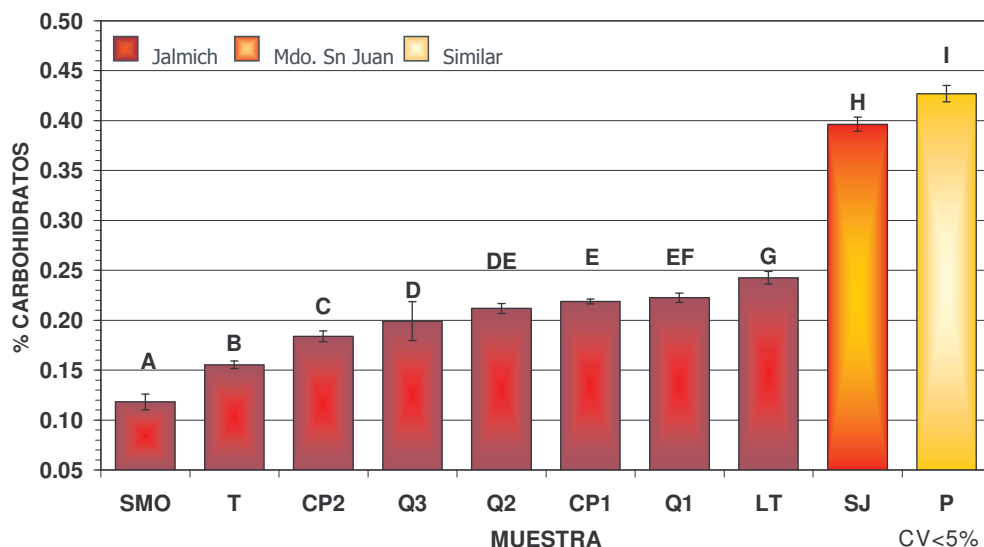
En este caso fue necesario llevar a cabo su determinación ya que en estudios previos [43], se observó que al estimar el total de carbohidratos totales por diferencia se obtenían valores entre 2

y 6% carbohidratos BS (ver *Tabla 6.1.*), lo cual era una concentración muy alta para este tipo de alimentos, pues se ha encontrado en la literatura que la cantidad de carbohidratos en los quesos madurados no debe ser mayor a 1%; aunque para algunos quesos secos italianos tienen un contenido de carbohidratos aproximadamente de 3%.

Tabla 6.1. Estimación de carbohidratos (g/100 g de materia seca)

QUESO	% GRASA	% PROTEÍNA	% CENIZAS	% CARBOHIDRATOS
Q ₁	43.3	43.7	10	3.0
Q ₂	47	39.1	9.5	4.4
CP ₁	46.7	39.3	9.1	4.9
T	44.3	41.7	8.7	5.3
Q ₃	43.7	42.3	8.8	5.2
SMO	45.1	40.8	9.1	5.0
CP ₂	40.7	42.5	11.2	5.6
LT	37.3	47.5	9.5	5.7
SJ	45	39.2	12.5	3.3
P	31.9	50.21	15.6	2.3

En la *Gráfica 6.6.* se observa que las muestras poseen un contenido de carbohidratos entre **0.12 y 0.24%**, con diferencias estadísticamente significativas entre casi todas las muestras. Esto se puede explicar principalmente, a que en el desuerado no se elimina la misma cantidad de lactosa; además de que el tipo y cantidad de microorganismos presentes en cada caso puede variar, por lo que la velocidad de degradación de la lactosa es diferente. Finalmente, este efecto también se ve influenciado por el tiempo de maduración que tenga cada uno de los quesos, es decir, entre mayor sea el tiempo de maduración, el contenido de carbohidratos será menor.



Gráfica 6.6. Contendio de carbohidratos BS de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
A,B,C,D,E, F,G,H e I Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Por ejemplo, la muestra que más tiempo de maduración puede tener es la muestra SMO por tener el menor contenido de carbohidratos de todas las muestras analizadas (0.12%). También se puede inferir que el tiempo de maduración de las muestras Q₂, CP₁ y Q₁ fue muy similar (0.21,0.21,0.22, respectivamente) ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre sí.

En cuanto a la muestra de San Juan (SJ), se observa que ésta presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás queso Cotija, pues contiene el mayor porcentaje de carbohidratos (0.4%), lo que indica que probablemente, presenta un menor tiempo de maduración que el resto de los quesos.

En la muestra de Pijijipan (P), el contenido de carbohidratos es todavía mayor (0.43%), lo que provoca que sea estadísticamente diferente a todas las demás muestras analizadas, con lo que se puede decir que el tiempo de maduración de este queso fue menor e incluso que el proceso de elaboración fue diferente al del queso Cotija.

Con estos resultados podemos darnos cuenta que alguna determinación ha sido subestimada debido a que la suma de los macrocomponente no proporciona el 100% del producto (*ver Tabla 6.2.*) probablemente el factor que más influyó en la subestimación de los valores fue la determinación de la humedad, por lo que se sugiere establecer las condiciones necesarias para su determinación en estufa al vacío ya que la determinación mediante estufa a 100 °C puede generar una sobreestimación por los compuestos volátiles que este producto contiene. Asimismo, la termobalanza no ha resultado ser una buena opción para este queso debido a la proyección de la muestra y/o fundido, lo cual no resulta viable en esa determinación.

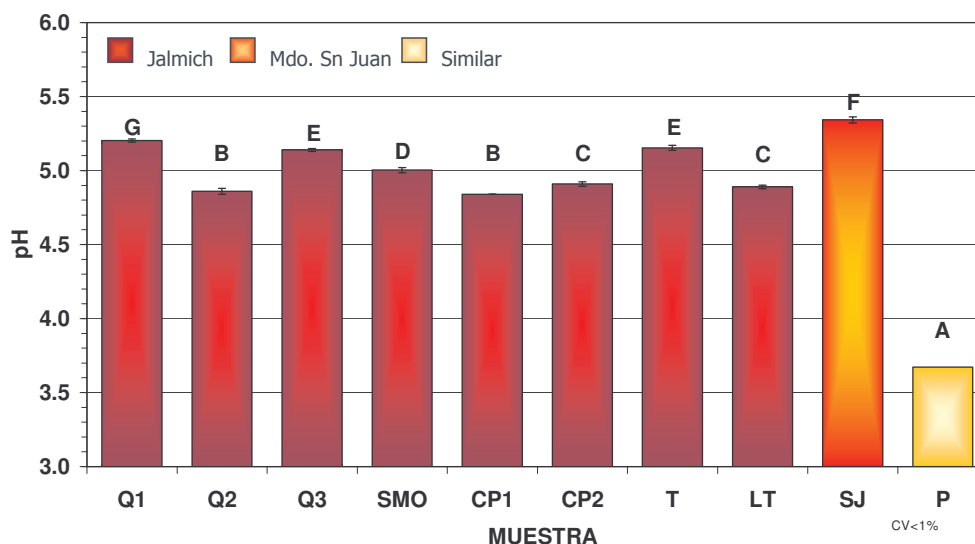
Tabla 6.2. Composición proximal de los quesos de Jalmich, San Juan y Chiapas (g/100 g queso)

QUESO	%HUMEDAD	% GRASA	% PROTEÍNA	% CENIZAS	% CARBOHIDRATOS	% TOTAL
Q ₁	26	26	26.3	6	0.13	97.13
Q ₂	32	32	26.7	6.5	0.14	95.74
CP ₁	27.5	27.5	26.8	6.2	0.15	95.25
T	29	29	28.1	5.8	0.10	94.80
Q ₃	27.5	27.5	27.2	5.8	0.12	94.92
SMO	30.3	30.3	26.7	5.7	0.08	95.08
CP ₂	26.2	26.2	26.7	7.2	0.12	94.52
LT	23.5	23.5	29.9	6	0.15	94.45
SJ	27.2	27.2	23.7	7.5	0.24	96.94
P	13.3	13.3	21	6.5	0.18	97.88

6.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

6.2.1. DETERMINACIÓN DE pH Y ACIDEZ

Se puede observar que los quesos Cotija de la región de Jalmich se encuentran dentro de un intervalo de pH de **4.8-5.2** (ver *Gráfica 6.7.*), entre el cual existen muestras que no presentan diferencias significativas entre sí, como es el caso de CP₂ y LT, CP₁ y Q₂ o Q₃ y T; en el que solamente Q₁ y SMO resultaron estadísticamente diferentes a todas las demás muestras de queso Cotija de la región de Jalmich.

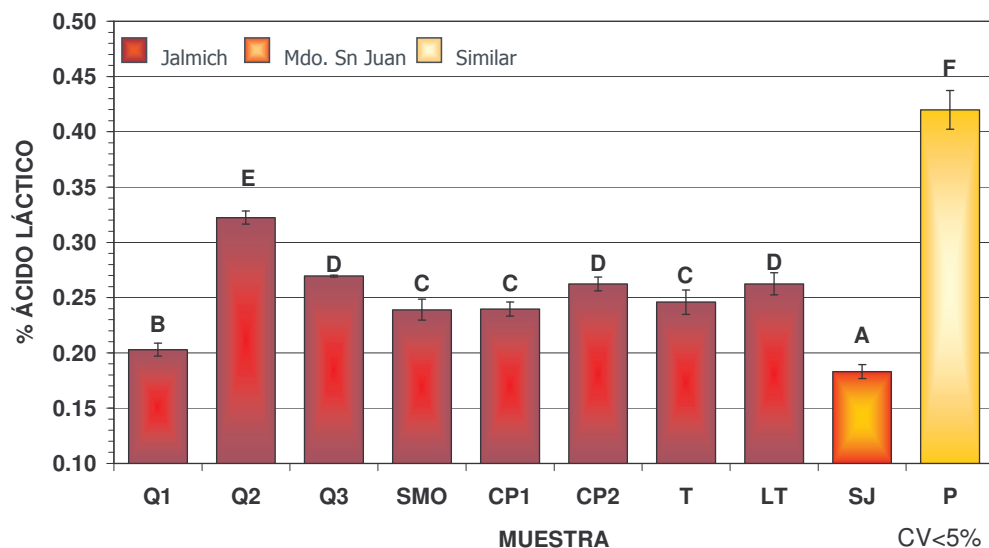


Gráfica 6.7. pH de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
 A,B,C,D,E,F y G Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Así mismo, estas muestras presentan un contenido de acidez de **0.20-0.32%** (ver *Gráfica 6.8.*) y nuevamente se observa que existen muestras que no presenta diferencias significativas, lo cual indica que, probablemente, la etapa de maduración puede estarse realizando en condiciones similares entre los productores como es el caso de las muestras SMO, CP₁ y T, o bien, LT, CP₂ y Q₃. La muestra Q₁ y Q₂ si fueron estadísticamente diferente al resto de las muestras de la región de Jalmich.

Este porcentaje de acidez refleja la cantidad de ácido orgánicos que han sido producidos por el metabolismo de los microorganismos presentes en el queso, ya sean homo o heterofermentativos. Estos últimos, al consumir la lactosa producen ciertos compuestos como ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, etc.) y otros productos responsables del aroma (acetil-metil carbinol, diacétilo, etc.); sin embargo, la acidez es expresada como ácido láctico debido a que es el ácido predominante. Actualmente, se sabe que las principales bacterias lácticas presentes en el queso Cotija que participan en esta transformación son del género *Enterococci*, particularmente, *E.*

faecium y *E. faecalis*, las cuales juegan un papel importante en la producción de alimentos fermentados de manera tradicional [135]. Estas bacterias crecen a temperaturas entre 10 y 45 °C en una concentración de NaCl de 6.5% y pH 4-9, condiciones que se presentan en el queso Cotija. Son anaerobias facultativas, homofermentativas, lo que corrobora el porcentaje de acidez expresada como ácido láctico. Sin embargo, estas bacterias presentan una baja habilidad de acidificación (además de una baja actividad lipolítica y proteolítica), lo cual explica la baja acidez encontrada en comparación con otro tipo de queso, por ejemplo la muestra P. [44,46,47]



Gráfica 6.8. Contenido de acidez de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
A,B,C,D,E y F Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Por otro lado, al llevarse a cabo la transformación de lactosa a ácido láctico se aumenta la concentración de iones hidronio (H_3O^+) y, con ello, la disminución del pH (*ver Ecuación 1.3*). Es interesante observar que esta relación no se cumple en algunas de las muestras, probablemente por que durante el proceso de maduración se producen otras especies ionizables que pueden neutralizar el ácido producido en la fermentación de la lactosa, por ejemplo, en la proteólisis, donde se puede llegar a liberar amoníaco por la actividad de la microbiota presente en el queso durante esta etapa del proceso. [110,131]

A pesar de todo esto, se puede observar que las muestras de queso Cotija presentan valores de pH menor en comparación con otros quesos reportados con un contenido de humedad similar como: Gruyère (5.7), Manchego (5.6), Cheddar (5.4), Brick (6.4), Cheshire (5.3), Gouda (5.8), Emmental (5.6), Halloumi (5.3), Pedroches (5.1) y Parmesano (5.4); lo cual, puede ser una característica distintiva de este queso, responsable de la textura desmenuzable debido a la mayor degradación de las proteínas. Aunque existen otro tipo de quesos que presentan valores similares de pH como el Mozzarella (5.2); sin embargo, este queso presenta características muy diferentes

en comparación con el Cotija (por ejemplo, una pasta blanda y elástica). Por todo ello, podemos decir que este parámetro puede ser un factor distintivo del queso Cotija desde el punto de vista químico y sensorial [71,84,104,107]

Por otro lado, la muestra del mercado de San Juan (SJ) presenta el mayor pH ($\text{pH}=5.34$) y la menor acidez (0.18% ácido láctico), en el que ambos parámetros, estadísticamente diferentes a todas las demás muestras de queso Cotija.

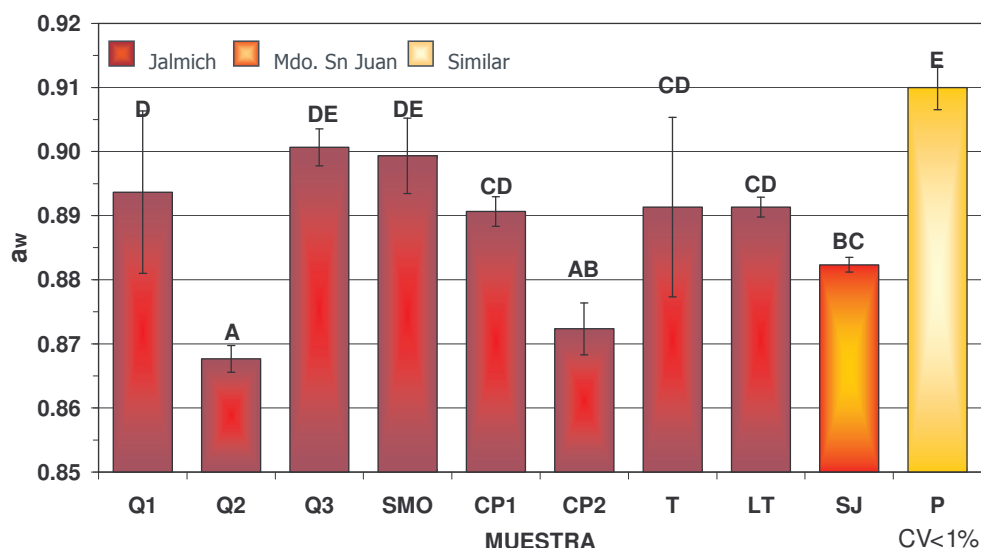
En cuanto a la muestra de Pijijipan (P), se observa que, al contrario de la anterior, presenta el menor pH ($\text{pH}=3.67$) y, en consecuencia una mayor acidez (0.42% ácido láctico), que actúan como factores significativos en el control de crecimiento de la microbiota presente. Es importante destacar que tanto el pH como la acidez de este queso son estadísticamente diferentes a todas las demás muestras estudiadas, lo cual puede observarse claramente en la *Grafica 6.7* y *6.8.*, respectivamente. Por todo ello, este queso presenta diferencias en el aspecto sensorial, es decir, el consumidor lo percibe como más agrio y con una textura frágil (posiblemente por la desmineralización de la cuajada), según el estudio en paralelo. [124]

Finalmente, la concentración de acidez encontrada en este tipo de quesos es menor a la reportada en otros quesos donde se utilizan cultivos iniciadores^a, y en donde se han reportado valores de hasta (0.65%). Por lo anterior, es probable que en el queso de Pijijipan analizado si se hayan agregado estos cultivos, caso contrario al queso Cotija Región de Origen. [93]

6.2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUOSA

Al observar la *Grafica 6.9*, podemos darnos cuenta de que todas las muestras de queso provenientes de la región de Jalmich presentan una a_w en un intervalo de 0.87-0.90, por lo que se podría sugerir que los quesos Cotija oreados de la región de Jalmich deberán presentar un valor máximo de $a_w=0.90$. Es importante aclarar que en este caso, no se puede establecer un intervalo de actividad acuosa ya que ésta disminuirá durante todo el proceso, por ejemplo, durante las primeras etapas de elaboración, el queso presenta una $a_w \approx 0.99$, la cual soporta el crecimiento y actividad de microorganismos, sin embargo, después del desuerado, salado y durante el tiempo de maduración, los niveles de a_w son significativamente menores ya que la pieza va perdiendo humedad por lo que el valor de a_w llega hasta valores tan bajos como 0.85 (valor encontrado dentro del grupo de trabajo en un queso muy maduro (aproximadamente 12 meses). En esta actividad acuosa podrían crecer levaduras (límite de detección alrededor de 0.83) y/o mohos (límite de crecimiento a valores de $a_w=0.75$), aunque estos no se han encontrado en el producto. [45,107]

^a Mezclas o cepas bien definidas de bacterias ácido lácticas como son: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



Gráfica 6.9. Actividad acuosa de los queso de Jalmich, San Juan y Chiapas
 A,B,C,D y E Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Podemos resaltar que valores de a_w tan bajos, aseguran que patógenos como *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahemolyticus* y *Yersenia enterolítica*, no estarían presentes. Esto es de suma importancia si recordamos que la leche con la que se elabora el producto no ha sufrido ningún tratamiento térmico, por lo que si estuviera contaminada con algún patógeno, éste no permanecería en el queso y, por lo tanto, no podría causar daño al consumidor. Este hecho es válido siempre y cuando no este presente la toxina de los 2 primeros, por lo que se recomienda a todos los productores emplear desde un inicio las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para evitar así la contaminación con este tipo de microorganismos. [107]

Por otro lado, en la gráfica se observa que la muestra Q_2 es la que presenta el a_w más bajo ($a_w=0.868$), por lo tanto tendrá la menor probabilidad de contaminación microbiana, limitándola solo a algunas especies y en consecuencia, una mayor vida de anaquel con respecto a las demás muestras analizadas. Es importante mencionar que esta muestra no presenta diferencias significativas con la muestras CP_2 ($a_w=0.872$), por lo que se puede considerar que su vida de anaquel también será mayor.

Con todo lo anterior, podemos decir que este parámetro es distintivo del queso Cotija, el cual puede ser el factor principal que contribuye a su vida útil prolongada.

Al realizar una comparación con diversos quesos, observamos que la mayoría de los quesos se encuentran en valores a_w mayores a 0.90 (valores mínimos en donde pueden crecer la mayoría de las bacterias); por ejemplo, Roquefort y Provolone ($a_w=0.91$), Romano ($a_w=0.94$), el Parmesano ($a_w=0.92$) etc. Dentro de los más parecidos encontramos al Cabrales y el Prismo con un a_w de 0.90. [42]

En cuanto a la muestra de queso Cotija del Mdo. de Sn. Juan, se observa que no presentó diferencias significativas con diversos quesos auténticos como T, CP₁, CP₂ y LT. Esto podría deberse a que el proceso de elaboración y/o maduración pudo realizarse de manera similar.

Finalmente, se observó que la muestra P no presenta diferencias estadísticamente significativas con las muestras Q₃ y SMO pero sí con las restantes. Por otro lado, se observa que esta muestra presentaba la mayor actividad acuosa ($a_w = 0.91$), lo cual era de esperarse ya que, anteriormente, se había observado que presentaba el mayor contenido de humedad (*ver Sección 6.1.1*) y, por lo tanto menor una vida de anaquel en comparación con las demás muestras analizadas. Esto se debe a que al tener la actividad acuosa más alta, el riesgo de contaminación microbiana, principalmente por el crecimiento de bacterias, es mayor.

Se sabe que al evaporarse el agua de la superficie del queso durante la maduración se reduce la actividad acuosa; sin embargo existe otro factor que influye en los valores de la actividad acuosa como es el cloruro de sodio añadido al queso. Aunque en las *Graficas 6.3. y 6.9.*, no se ve claramente esta relación. Probablemente, esto se deba a la presencia de otros solutos de bajo peso molecular, como péptidos, aldehydos, cetonas, azúcares, etc. aunque éstos últimos se encuentran en muy bajas concentraciones.

Finalmente, se relacionó la actividad acuosa con la concentración de NaCl mediante la ecuación $a_w = 0.997 - 0.604 X_{NaCl}$ (*ver Sección 1.1.4*) para poder obtener la a_w teórica y así compararla con la a_w experimental (*ver Tabla 6.3.*). En esta comparación se obtuvo un buen coeficiente de correlación, por lo que podemos decir que la ecuación podría ser empleada para una estimación de la actividad acuosa, en caso de no contar con el equipo correspondiente.

Dentro de las muestras que presentaron una diferencia apreciable entre el a_w experimental y el teórico fueron las muestras SMO ($a_w \text{ TEORICA} > a_w \text{ EXPERIMENTAL}$) y la P ($a_w \text{ TEORICA} < a_w \text{ EXPERIMENTAL}$). Esto puede deberse a que, como ya se mencionó anteriormente, el contenido de humedad obtenido experimentalmente no fue el contenido real en las muestras, por lo que al utilizar estos valores en la ecuación provoca discrepancia entre el valor teórico y el experimental.; sin embargo también podría deberse a que hay que considerar otros parámetros dentro de la ecuación, por ejemplo el contenido de la proteína, etc. [107]

Tabla 6.3. Relación de la actividad acuosa teorica y experimental

MUESTRA	a _w EXPERIMENTAL	a _w TEORICA	Coef. Correl.
Q ₁	0.894 ± 0.014	0.904 ± 0.001	0.9889
Q ₂	0.868 ± 0.013	0.870 ± 0.000	0.9988
CP ₁	0.891 ± 0.004	0.896 ± 0.000	0.9944
T	0.891 ± 0.006	0.887 ± 0.001	1.0045
Q ₃	0.901 ± 0.001	0.904 ± 0.001	0.9966
SMO	0.899 ± 0.002	0.927 ± 0.001	0.9697
CP ₂	0.872 ± 0.002	0.872 ± 0.000	1.0000
LT	0.891 ± 0.002	0.899 ± 0.001	0.9911
SJ	0.882 ± 0.003	0.870 ± 0.006	1.0137
P	0.910 ± 0.003	0.847 ± 0.002	1.0743

En resumen, el queso Cotija es, sin duda un queso mexicano genuino^b, por lo que es importante estandarizar su proceso de elaboración, desde el punto de vista tecnológico e higiénico; así como su composición química, para que de esta manera, se logren identificar las posibles etapas en la que los productores deben poner mayor atención para homogenizar el producto final. Todo esto con el fin de diferenciar el producto original de los producto “tipo queso Cotija”. Por todo ello, en la *Tabla 6.4*, se presenta una propuesta para la composición química promedio del queso Cotija Región de Origen, además de presentar algunos parámetros fisicoquímicos de calidad importantes por su efecto inhibitor de microorganismos indeseables en el producto y que de alguna manera contribuirán a prolongar la vida de anaquel. También, se observa que el contenido de humedad, proteína y grasa se encuentran dentro de los valores establecido en las Reglas de Uso; sin embargo, en este estudio, la concentración de los parámetros es un poco más estricta.

Tabla 6.4. Composición química promedio del queso Cotija Región de Origen oreado

PARÁMETRO	PROPUESTA		REGLAS DE USO
	Base húmeda	Base seca	Base Húmeda
Agua (%)	32-40		máx.36
Sólidos totales (%)	60-68		mín. 64
Proteína total (%)	min. 27	min. 39	min. 25
Grasa butírica(%)	min. 24	min. 37	min. 23
Minerales (%)	5.8-7.2	8.7-11.2	
NaCl (%)	2.6-4.0	4.7-7.4	
Carbohidratos (%)	0.08-0.15	0.12-0.24	
Acidez (% ácido láctico)	0.20-0.32		
pH	4.8-5.2		
a _w	máx. 0.90		
Kcal/100 g queso* (teórico)	mín. 324		

*Considerando que el aporte de las proteínas y carbohidratos es de 4 kcal/g y lípidos de 9 Kcal/g

^b También llamado autentico y/o natural, por oposición a aquellos de imitación, lo que implica cierta artificialidad, al menos por el diseño de la formula de mezcla y los aditivos empleados.

Así mismo, se calculó el aporte energético teórico del queso Cotija Región de Origen oreado, en el que se encontró que de acuerdo a la composición química, éste aporte se verá modificado (principalmente por el tipo de alimentación del ganado). Sin embargo, podemos establecer, al considerar los parámetros mínimos, que el queso debe cumplir con un aporte mínimo de **324 Kcal/100 g** queso.

Según el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes, el queso Cotija es considerado como un alimento de origen animal con alto aporte en grasa, lo cual podría ser de preocupación para el consumidor; sin embargo, podemos encontrar otros quesos que contienen mayor aporte energético como: el queso añejo (380 Kcal/100g), Cheddar (408 Kcal/100g), Edam (408 Kcal/100g), Brie (340 Kcal/100g), Gouda (360 Kcal/100g), Gruyere (416 Kcal/100g), Manchego (408 Kcal/100g) y Roquefort (376 Kcal/100g), primeramente. [67]

En la *Tabla 6.5*, se muestra el resumen de la comparación de los quesos que presentan características químicas similares con el queso Cotija. En esta Tabla podemos resaltar que, tanto por su composición como por sus características fisicoquímicas, no hay otro producto de este tipo que esté reportado en otra parte del mundo, por lo que su originalidad hacen a este queso un buen candidato para obtener la Denominación de Origen.

Tabla 6.5. Similitud del queso Cotija con otros quesos de pasta dura

QUESO	HUMEDAD (%)	NaCl	PROTEÍNA GRASA			Cenizas	pH	a _w
			(g/100 g materia seca)					
Parmesano	√	√	√	√	√			
Gruyere	√	√	√	√	√			
Manchego	√	√	√	√	√			
Pedroches	√	√	√	√		√		
Emmental	√	√	√	√				
Cheddar	√	√	√	√				
Brick	√	√	√	√				
Roqueford	√	√	√	√				
Gouda	√	√	√	√				
Cheshire	√	√	√	√				

√ Indica que son similares con el queso Cotija Región de Origen

SEGUNDA PARTE

6.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.3.1. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

Para la extracción de los compuestos polifenólicos se emplearon diversos solventes para asegurar su extracción, pues hay que recordar que como se desconocía la estructura de estos compuestos, tampoco se conocía solubilidad que presentarían en un disolvente. Los disolventes empleados en esta extracción fueron metanol, acetona y agua, ya que son los disolventes más frecuentemente empleados que, según algunos reportes en la literatura, presentan gran eficiencia en la extracción de estos compuestos fenólicos. [69,73]

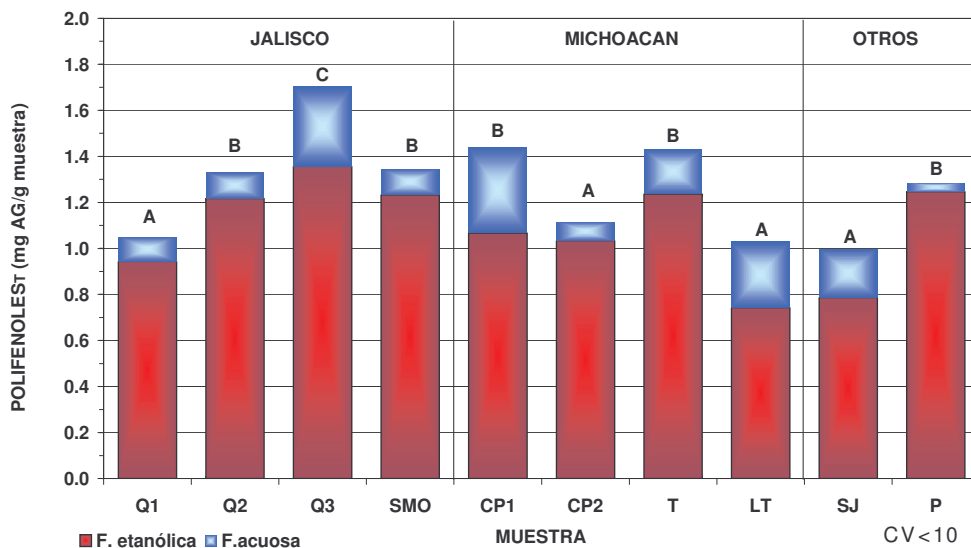
6.3.2. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Los compuestos polifenólicos se encuentran en los alimentos de origen vegetal por lo que forman parte importante tanto de la dieta humana como animal. En este caso, la presencia de estos compuestos en este tipo de productos, se debe al tipo de alimentación del ganado, es decir, provienen de las pasturas frescas que consumen las vacas utilizadas para la producción de la leche con la que se elabora este queso. [31,98]

En la *Gráfica 6.10*, se observa que el intervalo de concentración de polifenoles totales presentes en las muestras de queso Cotija Región de Origen fue de **1.0-1.7 mg AG/g queso**, con una relación $LT < Q_1 < CP_2 < Q_2 < SMO < T < CP_1 < Q_3$. En las cuatro primeras no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí; así como entre SMO, T y CP_1 . Por el contrario, la muestra Q_3 sí fue estadísticamente diferente a las muestras de queso Cotija auténtico, incluso, con el resto de las muestras analizadas.

Así mismo, se observa que la concentración de compuestos fenólicos no presentó una relación clara con el estado o zona de origen de las muestras, por ejemplo, para el caso de las muestras provenientes del estado de Jalisco, tenemos que la muestra Q_1 es la que contiene menor concentración de polifenoles totales con 1.05 mg AG/g queso (incluso en comparación con el resto de los queso Cotija auténtico) y la muestra Q_3 la que presentó la mayor concentración (1.70 mg AG/g queso). En cuanto a las muestras Q_2 y SMO, se observa que su concentración es muy similar entre sí (1.33 y 1.34 mg AG/g queso, respectivamente) ya que no presentan diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, en las muestras provenientes del estado de Michoacán tenemos que la que contiene un menor contenido de polifenoles es la LT con 1.03 mg AG/g queso (incluso en comparación con todas las muestras provenientes de la Región de

Jalmich). En contraparte, tenemos que la muestra CP₁ es la que presentó el mayor contenido de estos compuestos (1.44 mg AG/g queso); además de no presentar diferencias significativas con la muestra T (1.43 mg AG/g queso).



Gráfica 6.10. Concentración de PF en los diferentes quesos
^{A,B y C} Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Es importante mencionar que el extracto etanólico es el que contribuye con la mayor concentración de estos compuestos (1.22 mg AG/g queso, en promedio) ya que la fracción acuosa presenta un contenido muy bajo (0.21 mg AG/g queso, en promedio). Por lo tanto, podemos decir que, la naturaleza predominante de los compuestos fenólicos presentes en quesos es de naturaleza lipofílica, incluyendo a las muestras SJ y P que presentaron la misma tendencia.

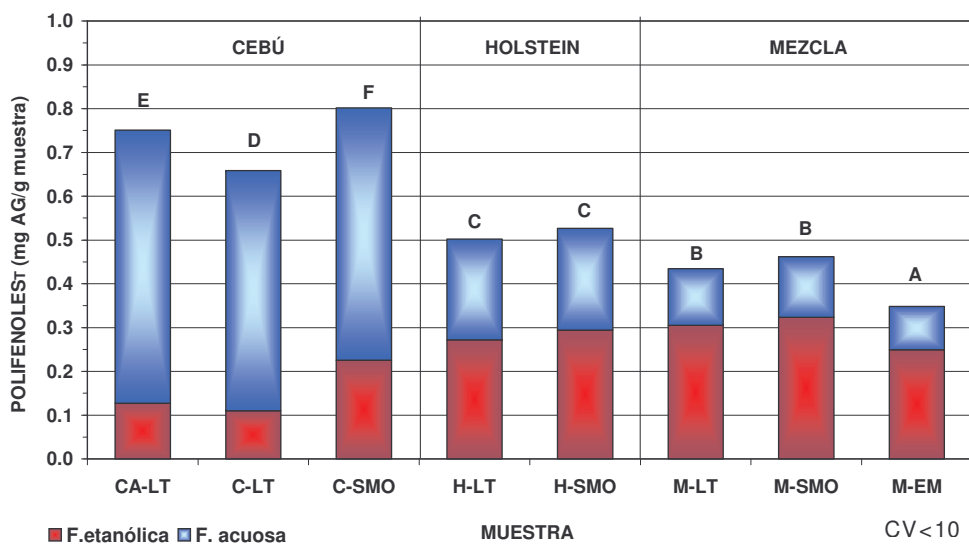
En el caso de la muestra SJ, el contenido de polifenoles totales fue menor en comparación con el resto de las muestras (1.00 mg AG/g) incluso menor que la muestra P (1.28 mg AG/g); sin embargo, aun así no presento diferencias estadísticamente significativas con algunas muestras de queso Cotija (LT, CP₂, y Q₁)

En el queso de Chiapas (P), se observa que la relación entre la fracción etanólica y la acuosa fue muy diferente del resto de las muestras lo que podría deberse a que la alimentación del ganado difiere a la de la región de Jalmich desde el punto de vista de la naturaleza de los compuestos polifenólicos.

Los resultados obtenidos se compararon con respecto a otros alimentos reportados en la literatura. En primera instancia, se compararon con un queso de cabra, por ser un producto

parecido al de nuestro interés, por no haber sido sometido a un tratamiento térmico y porque el ganado productor se alimentó mediante el sistema de libre pastoreo, además de que existe una escasez de estudios de los compuestos fenólicos reportados en sistemas alimentarios de origen animal. En este queso de cabra se encontraron concentraciones más bajas (0.78 mg AG/g) con respecto al queso Cotija (1.3 mg AG/g). Por ello, este último tendrá una ventaja en comparación con el de cabra e incluso con otro tipo de quesos, por ejemplo, los que han sufrido un tratamiento térmico ya que según Cuchillo (2006) este proceso también influye en el contenido de polifenoles. [22,31]

En la *Gráfica 6.11*, se muestra las concentraciones de polifenoles encontradas en distintas muestras de leche empleada para la elaboración de queso Cotija y una leche de un establo del Estado de México (M-EM). Aquí podemos observar que el intervalo de concentración de polifenoles en la leche proveniente de ganado de la región de Jalisco se encuentra entre **0.41 y 0.82 mg AG/g de leche**, en donde la muestra M-LT fue la que presentó una menor concentración de polifenoles y la muestra C-SMO es la que presentó la mayor concentración de estos compuestos.



Gráfica 6.11. Concentración de PF en las diferentes leche
 A,B,C,D,E y F Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Por lo tanto, en primera instancia podemos decir que efectivamente, el hecho de encontrar a estos compuestos polifenólicos en el queso se debe a la concentración proveniente desde la materia prima. Además, se observa que la concentración de polifenoles en la leche es menor a la

encontrada en el producto final, lo que puede ser explicado por un simple efecto de concentración que sufre la leche para la elaboración del queso.

Otro aspecto interesante a destacar, es el efecto de la raza sobre la concentración de estos compuestos fitoquímicos. En este estudio, el ganado Cebú presentó concentraciones mayores (0.66-0.80 mg AG/g leche) en comparación con las vacas Holstein (0.50-0.53 mg AG/ g de leche), por lo que nuevamente se reitera que a los productores les convendría emplear sólo ganado de raza Cebú (*ver Sección 6.1.4*), que de acuerdo a las Reglas de Uso del queso Cotija, es el tipo de ganado que se debería utilizar para asegurar la autenticidad del producto.

También se observa que la concentración de los compuestos fitoquímicos varía de acuerdo a la zona de procedencia de las muestras, es decir, se encontró que las muestras provenientes de la región de Santa María del Oro (SMO) presentaron concentraciones ligeramente mayores (0.6 mg AG/g leche, en promedio) en comparación a las de la región de La Tinaja (LT) (0.5 mg AG/g leche, en promedio). Estas diferencias se podrían explicar por la preferencia del ganado por cierto tipo de vegetación y por la cantidad de alimento que consumen, ya que se ha encontrado que la cantidad de polifenoles totales en las plantas varía ampliamente entre rangos de 0.2 y 155.3 mg/g. Por otro lado, no hay que olvidar que la propia individualidad de las vacas también es un factor a considerar. [56,57,73]

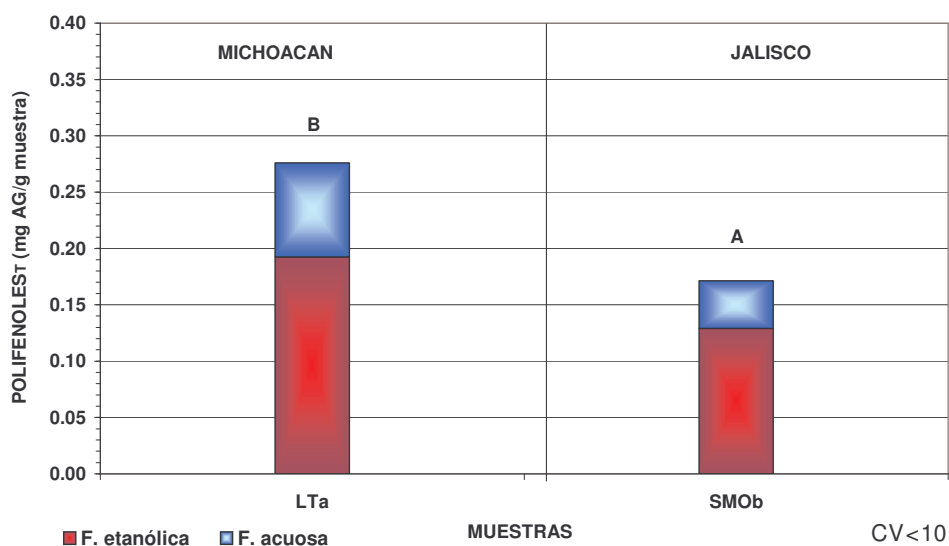
En cuanto a las mezclas de leche, se observa que presentan un menor contenido de polifenoles con respecto a todas las demás muestras analizadas (0.35-4.62 mg AG/g leche). Para los casos M-SMO y M-LT, este efecto puede deberse a un efecto de dilución ya que al ser la mezcla de leche de distintas vacas, se disminuyó la concentración total.

Por otro lado, se puede observar que la muestra M-EM proveniente de ganado estabulado, contenía la menor concentración de estos compuestos en comparación con las demás muestras (0.35 mg AG/g). Esta baja concentración de polifenoles puede deberse al efecto de dilución, anteriormente mencionado, al tipo de alimentación del ganado o, probablemente, por que no consuman tanta variedad de alimentos que proporcionen las concentraciones obtenidas en la leche de ganado alimentado por libre pastoreo, sin embargo, la concentración encontrada se puede deber al consumo de alimentos como cereales, que también proporcionan compuestos fenólicos, aunque en menor concentración que las plantas verdes. Por todo ello, podemos decir que la alimentación de libre pastoreo de los rumiantes aporta una mayor cantidad de compuestos polifenólicos que el alimento de ganado estabulado. Esto se corrobora con otros estudios en los que se estableció que el tipo de alimentación al que es sometido el ganado influye, de manera estadísticamente significativa, sobre el contenido polifenólico, en donde el sistema de libre pastoreo es una mejor opción. [31]

Al observar la concentración de los compuestos polifenólicos en cada una de las fases, podemos decir que para el ganado Cebú, la fracción acuosa es la que más contribuyó a la concentración total de compuestos polifenólicos, lo cual hace referencia a que la naturaleza de estos compuestos es hidrofílica, situación contraria al resto de los quesos, en donde la concentración de polifenoles predominó en la fase etanólica (naturaleza lipofílica). Por lo tanto, la naturaleza de los compuestos polifenólicos en el queso dependerá de la naturaleza lipofílica o hidrofílica que predomine en la mezcla de leches empleada para la elaboración.

Por otro lado, en la *Gráfica 6.12*, se observa la cantidad de compuestos polifenólicos presentes en el subproducto de la elaboración del queso, el lactosuero. Este subproducto proviene de las muestras M-SMO y M-LT.

Las muestras SMO_a y LT_b presentaron una concentración de 0.23 y 0.21 mg AG/ g suero, respectivamente con diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 6.12. Concentración de PF en el suero
^{A y B} Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$

Con estos resultados, podemos decir que durante la elaboración del queso, se pierden compuestos polifenólicos, la cantidad dependerá del proceso de elaboración; por ejemplo, del tiempo de desuerado, lo que se traduce como la cantidad de suero eliminado en el que se pierden estos compuestos.

Se observa que la muestra SMO_b contiene una menor concentración de polifenoles que la LT_a , lo cual indica una menor pérdida de estos compuestos, durante el desuerado y, si recordamos que la leche de la que partimos contenía una mayor cantidad de polifenoles (*ver Gráfica 6.12*),

entonces, probablemente el queso de Santa María del Oro presentará una mayor concentración de compuestos polifenólicos que el queso de La Tinaja, lo que podría traducirse en mayores beneficios.

El hecho de encontrar este tipo de compuestos en el lactosuero, puede ser importante para que los productores consideren elaborar productos alimenticios a base de éste, con el objetivo de mejorar el valor biológico y/o las propiedades funcionales de los alimentos (estos beneficios han sido comprobados en diversos estudios), además de obtener un beneficio por el valor agregado, en vez de sólo emplearlo para la alimentación de su ganado.

Al comparar la concentración de polifenoles encontrada en el queso, la leche y el lactosuero con otro tipo de alimentos encontramos que, en general, presentan una concentración baja en comparación con cebollas, zanahorias, espinacas, tomates, brócoli, manzanas, bellotas, fresas (2.5, 6.6, 9.9, 4, 10, 12, 13,16 mg AG/g, respectivamente); y más aun con hoja de arce, café de grano, soya, amaranto, plantas medicinales, té negro, café instantáneo, té verde y paja (31.7, 58, 63, 89, 86, 113, 149, 131,155 mg AG/g, respectivamente). Sin embargo también podemos encontrar alimentos con concentraciones menores como: uvas, moras, naranjas, limón, avena, cebada y mango (0.117, 0.118, 0.14, 0.3, 0.4, 0.545 mg AG/g, respectivamente) a excepción del suero y algunas leches. [28,123]^c.

6.3.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CUALITATIVA

La evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica de cromatografía en capa fina, es importante ya que nos da una idea generalizada de la actividad que presentan las muestras en cuestión. Además es un método muy rápido (puede completarse en menos de 1 hora), de bajos costos de operación y simplicidad; además de que existe la posibilidad de analizar varias muestras simultáneamente. [114,121]

Se analizó la capacidad antioxidante de los polifenoles extraídos (fracción acuosa y etanólica) de los quesos, leche y lactosuero (*ver Figuras 6.13.,6.14. y 6.15.*), esta actividad se logró medir debido al cambio de coloración (púrpura a amarillo) causado por la reducción del radical DPPH, asperjado sobre la placa, por la presencia de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante que pueden provenir de la alimentación del ganado cuya leche se utiliza para la elaboración del queso Cotija. La tonalidad amarilla, reflejó la capacidad de los extractos lácteos para donar hidrógenos y estabilizar las moléculas oxidantes (en este caso el radical). La actividad antioxidante se consideró baja para todas las muestras analizadas en comparación con los estándares empleados (Trolox, BHA, BHQ y TBHQ).

^c NOTA: es importante mencionar que estos valores varían dependiendo la fuente.



Figura 6.13. Actividad antioxidante cualitativa de distintas muestras de queso Cotija
(a) Fracción etanólica y (b) Fracción acuosa



Figura 6.14. Actividad antioxidante cualitativa de distintas muestras de leche
(a) Fracción etanólica y (b) Fracción acuosa

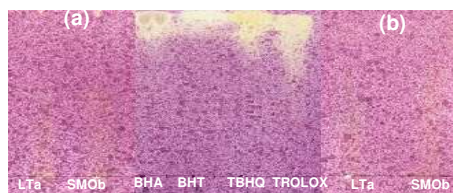


Figura 6.15. Actividad antioxidante cualitativa de distintas muestras de suero
(a) Fracción etanólica y (b) Fracción acuosa

Otro aspecto que se puede observar en general, es el hecho de que algunos compuestos polifenólicos no eluyeron con la fase móvil; sin embargo, podemos darnos cuenta que también contribuyen a la actividad antioxidante ya que se puede apreciar la decoloración del radical DPPH, por la reducción del mismo. Este fenómeno puede deberse a que los extractos crudos son de composición compleja por lo que frecuentemente la separación de los fitoquímicos antioxidantes puede no ser satisfactoria.

Al observar *las Figuras 6.13. a 6.15.* correspondientes a la evaluación de la actividad antioxidante cualitativa, podemos decir que dentro de todas las muestras analizadas (queso, leche y suero) las que presentaban mayor actividad antioxidante eran las correspondiente a la fracción etanólica.

En la *Figura 6.13*, podemos darnos cuenta que todas las muestras de queso Cotija autentico, presentan una actividad antioxidante similar entre si. Esta apreciación de la actividad puede deberse a que la técnica empleada no es tan sensible para detectar las variaciones y/o que el ojo

humano no detecta las diferencias por lo que se cataloga a las muestras con actividades similares. Este mismo caso se presenta entre las muestras de leche (*ver Figura 6.14*) y de suero (*ver Figura 6.15*) independientemente, de la raza de la que provenían. También se observa que la fracción en donde se presentó la mayor actividad antioxidante en los quesos, correspondió a la fracción etanólica, probablemente por la naturaleza de los compuestos presentes.

De manera general, podemos decir la relación que existe en la actividad antioxidante de las muestras analizadas es en el queso>leche>lactosuero.

6.3.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CUANTITATIVA

6.3.4.1. CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL DPPH

Es importante mencionar que se partió de la misma concentración de compuestos polifenólicos (200 ppm) con el fin de observar el efecto de la capacidad secuestrante a una misma concentración. La naturaleza de los compuestos polifenólicos en cada una de las muestras (queso, leche y suero) fue un factor fundamental para observar diferencias en la actividad antioxidante.

En la *Figura 6.16*, se observa la cinética de la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos presentes en los quesos, aquí se aprecia que la rapidez con que se efectúa la reducción del radical DPPH, tanto en la fracción etanólica como acuosa, es similar entre las muestras durante un periodo de 20 minutos. Esta similitud nos puede dar indicios de que los compuestos polifenólicos que están interviniendo en esta reacción son muy similares en su naturaleza química, lo que es de esperarse ya que el alimento que consumen las vacas se encuentra en un área delimitada de la sierra de Jalmich.

La muestra SJ se comporta de manera similar que los quesos de la Región de Jalmich, sin embargo, es muy claro observar que la rapidez de la reacción en la muestra P es menor que en todos los casos anteriores.

En general, se observa que las muestras presentan una menor rapidez para estabilizar este radical cromóforo en comparación con el Trolox (estándar) pues este último, disminuye significativamente su absorbancia después de 1 min de iniciada la reacción.

Para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos fue necesario observar su comportamiento frente a un compuestos oxidante, que en este caso fue el DPPH y, así determinar la actividad mediante el porcentaje de capacidad secuestrante de los compuestos polifenólicos presentes en cada una de las muestras.

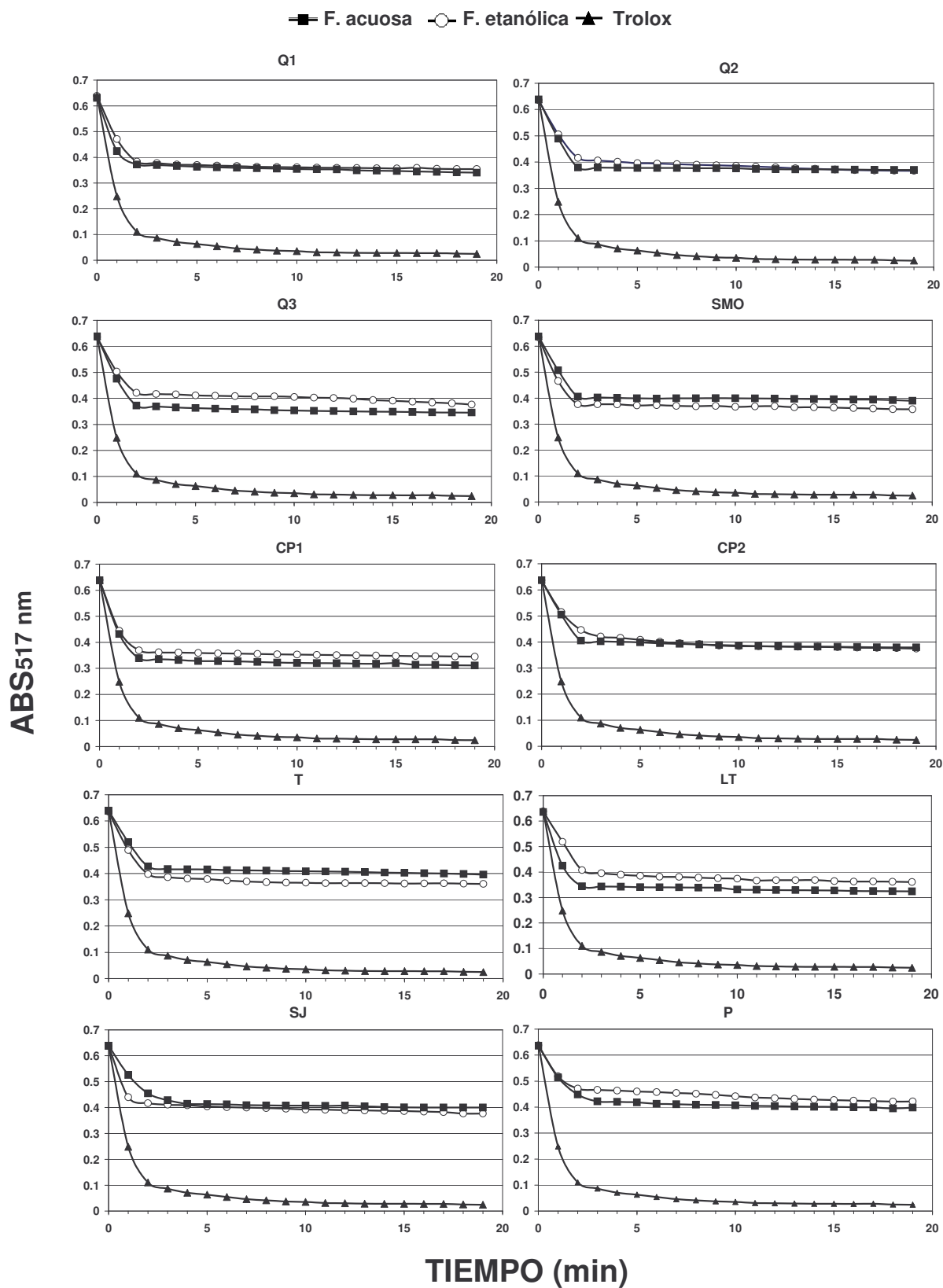
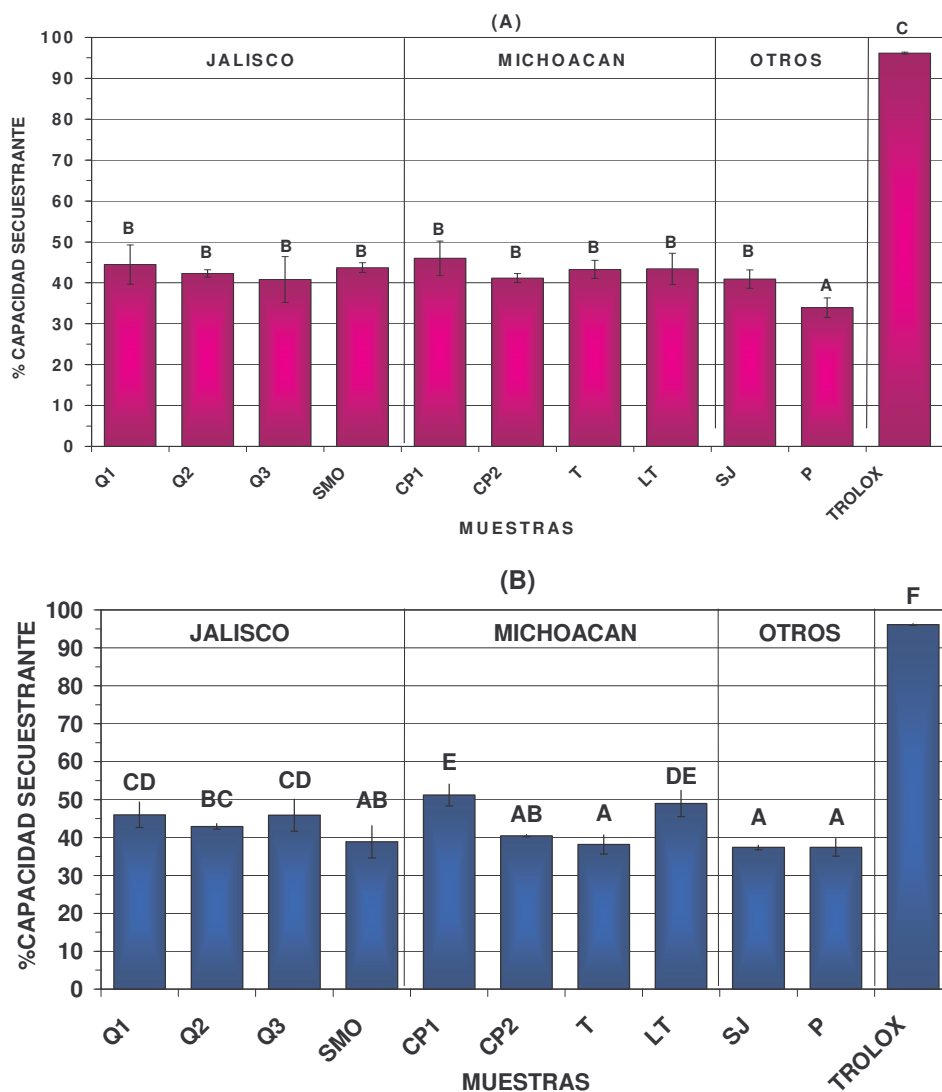


Figura 6.16. Cinética de la actividad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de quesos

En la Gráfica 6.13. (A), se observa que el intervalo de capacidad secuestrante de los compuesto de naturaleza lipofílica a 200 ppm varía desde **41** a **46%** en las muestras de queso Cotija Región de Origen, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellas, por lo que se puede decir que los compuestos lipofílicos ingeridos por el ganado son homogéneos. Sin embargo, estos quesos si presentaron diferencias significativas con el Trolox, ya que este estándar presentó, aproximadamente, el doble de la actividad encontrada en las muestras (96%).



Gráfica 6.13. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de queso Cotija (A) Fracción etanólica y (B) Fracción acuosa

En cuanto a la muestra SJ, se observa que su capacidad secuestrante sobre el radical DPPH (40.9%) no presentó diferencias significativas en comparación con las muestras de queso Cotija auténtico, por lo que los beneficios encontrados serán similares en el alimento, caso contrario con el estándar.

En cambio, la muestra P si presentó diferencias estadísticamente significativas con todos los quesos Cotija debido a que presentó una menor capacidad secuestrante (33.9%), de tan solo la tercera parte de la actividad encontrada en el estándar, por lo que también presentó diferencias significativas con él.

En la Gráfica 6.13 (B) se observa que los quesos de la región de Jalmich, presentaron una capacidad secuestrante entre un intervalo de **38-51%** a 200 ppm de compuestos polifenólicos hidrofílicos con diferencias estadísticamente significativas entre algunas de las muestras. Estas diferencias podrían explicarse de dos maneras; la primera opción podría ser que la proporción de los compuestos hidrofílicos que consume el ganado no es tan homogénea como en el caso de los lipofílicos; la segunda opción podría explicarse con la limitación del método al medir actividades de compuestos de naturaleza hidrofílica, o bien, podrían ser resultado de ambos efectos.

La actividad encontrada en la fracción acuosa, al igual que en la etanólica, no es despreciable al compararlo con el estándar pues algunas presentaron la mitad de la actividad encontrada en el Trolox, por ejemplo, el queso CP₁ y LT (51.2 y 48.9 %, respectivamente)

La muestra SJ presentó una actividad antioxidante de 37.4%, más de la tercera parte de la del Trolox y no presentó diferencias significativas con algunas de las muestras de queso Cotija Región de Origen porque como ya se ha mencionado, este queso pudo haber sido elaborado por alguno de los productores auténticos, por lo que el tipo de polifenoles ingeridos por el animal presentan actividades similares

También se observó que la muestra P no es estadísticamente diferente a algunas de las muestras analizadas, una explicación podría ser que, la alimentación del ganado para la elaboración de este queso pudo contener diferentes polifenoles con actividad similar (38%) a los que están presentes en algunos quesos Cotija

Un aspecto importante en ambos casos, es ver que la zona de producción no es un factor clave para diferenciar la capacidad secuestrante de los compuestos presentes en los quesos, quizá porque el lugar donde pastorea el ganado es un área delimitada, por lo que se disminuye el efecto de esta variable.

De manera general, se observa que la muestra con mayor actividad secuestrante, en ambas fracciones, fue la muestra CP₁ proveniente del estado de Michoacán, y la muestra P la de menor actividad, la cual corresponde al ganado alimentado bajo el sistema estabulado.

Estos resultados se pueden comparar con un estudio sobre queso de cabra elaborado con leche cruda, en el que el ganado se alimentó mediante libre pastoreo. En este estudio se encontró una actividad de 26.9%; por lo tanto, podemos decir que el queso Cotija presentará mayores beneficios por el hecho de presentar una mayor actividad antioxidante.

Por otro lado, en la *Figura 6.17*, se observa que la cinética de la capacidad secuestrante de las muestras de leche fue muy similar. Por ejemplo, en ambas fracciones de todas las muestras, la rapidez de reacción de los compuestos polifenólicos fue menor en comparación con la habilidad de donar hidrógenos del Trolox.

También se observa que la muestra M-EM fue la que presentó una cinética diferente al resto de las muestras, su comportamiento describe que la reacción de reducción del radical fue la más lenta de todas las muestras de leche.

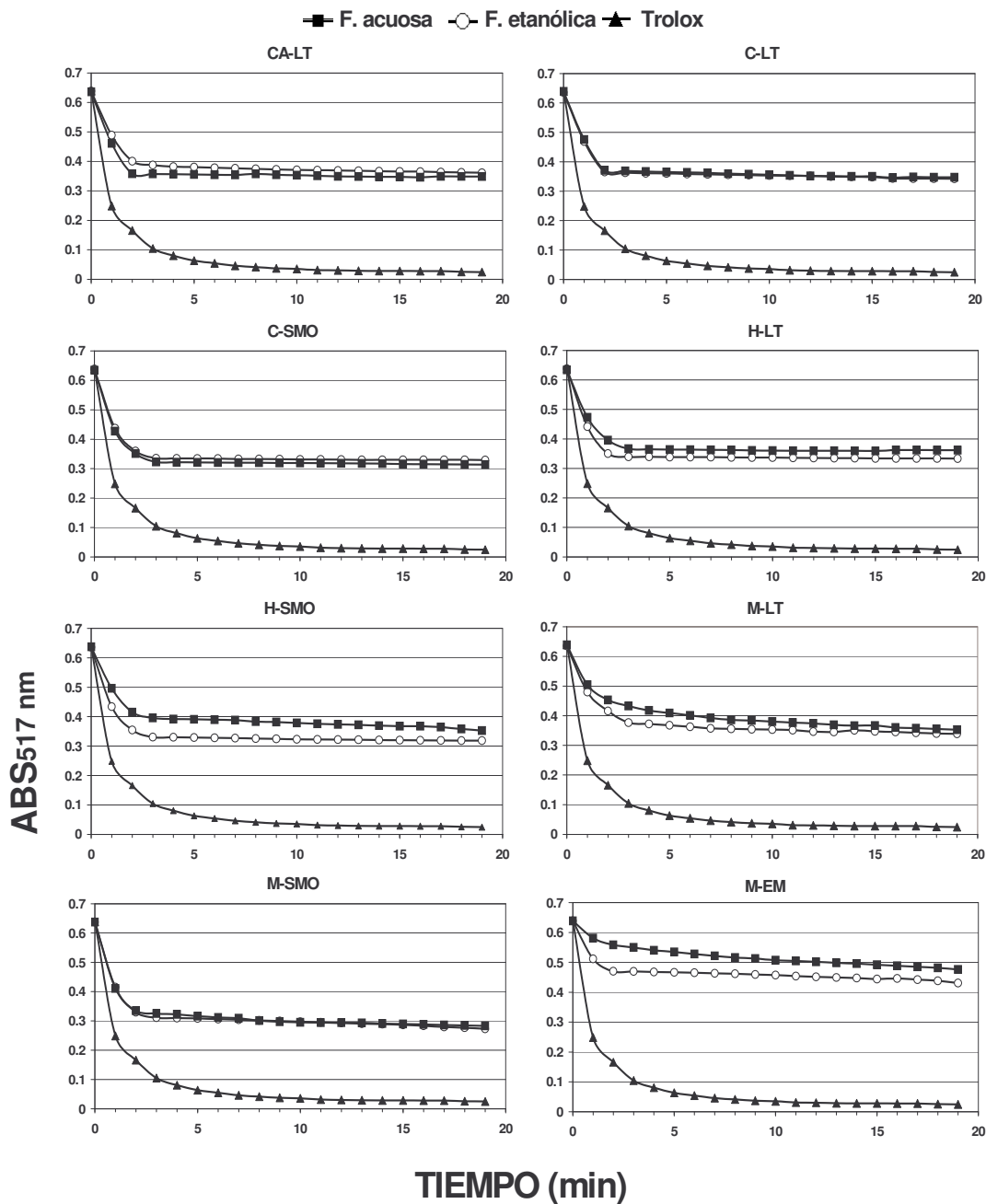
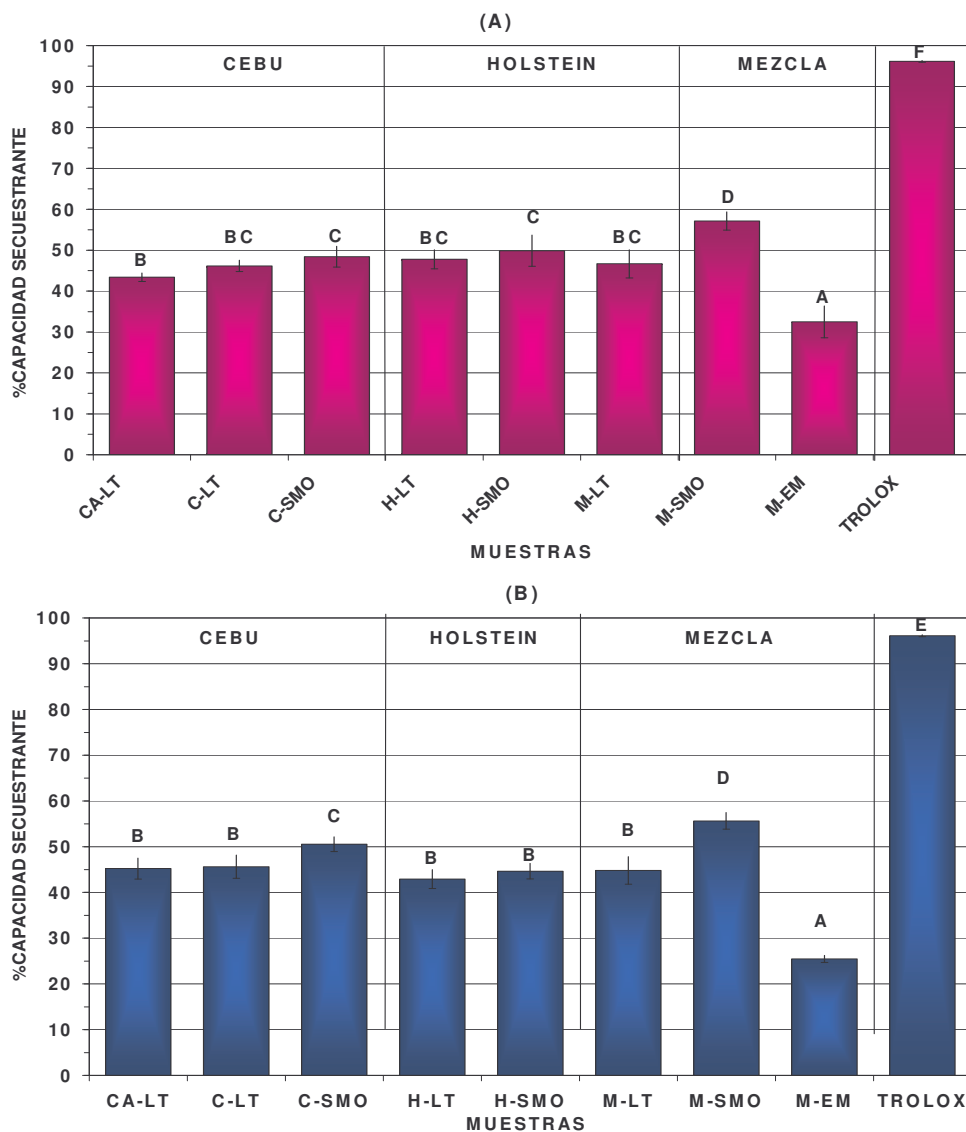


Figura 6.17. Cinética de actividad secuestrante por el radical DPPH de distintas muestras de leche

En la *Gráfica 6.14.* se muestra la actividad antioxidante que presentaron las distintas muestras de leche, tanto en la fase etanólica (A) como en la acuosa (B), la cual oscila entre 43-51%.



Gráfica 6.14. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de leche
(A) Fracción etanólica y (B) Fracción acuosa

De manera general, se observa que todas las muestras provenientes de Santa María del Oro no presentaron una capacidad secuestrante significativamente diferente a las muestras proveniente de La Tinaja. En cambio, las mezclas de leche provenientes de Santa María del Oro y del Estado de México, si presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí y con el resto de las muestras, en ambas fases. La muestra M-SMO fue la que presentó la mayor actividad antioxidante de todas las leches, probablemente este comportamiento se deba al tipo de

polifenoles presentes, o bien, que entre los compuestos polifenólicos se haya presentado un efecto sinérgico. En cambio, la muestra M-EM, fue la que presentó la menor habilidad de donar hidrógenos al radical, por lo que se reitera que la alimentación del ganado, es un factor que influye tanto en la concentración como en la actividad de estos compuestos. Estos resultados confirman lo estipulado por Cuchillo (2006), en donde se establece que los productos elaborados con leche obtenida de ganado alimentado por libre pastoreo presentarán mayores ventajas sobre los que se alimentan por el sistema estabulado. Para este caso, la actividad de la muestra M-EM es aproximadamente la mitad de la actividad encontrada en las muestras de la región de Jalisco.

Al comparar entre razas, podemos observar que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras de ganado Cebú y Holstein, sin embargo, tampoco se ve una tendencia clara de la actividad antioxidante en función de la raza del ganado.

Finalmente, las muestras evaluadas de los productores auténticos muestran diferencias significativas con respecto al estándar empleado, sin embargo, su actividad no es despreciable ya que representan aproximadamente el 50% de la capacidad secuestrante del compuesto control (Trolox), por ejemplo, la muestra M-SMO presentó la mayor actividad secuestrante (57.1% en la fase etanólica y 55.6% en la fase acuosa), es decir más de la mitad de la actividad del estándar.

En la *Figura 6.18*, se muestra que los lactosueros obtenidos en la elaboración de quesos Cotija (SMO_a y LT_b), presentaron una rapidez baja para estabilizar el radical, además se puede apreciar que esta rapidez es menor en el lactosuero LT_b con respecto al suero SMO_a .

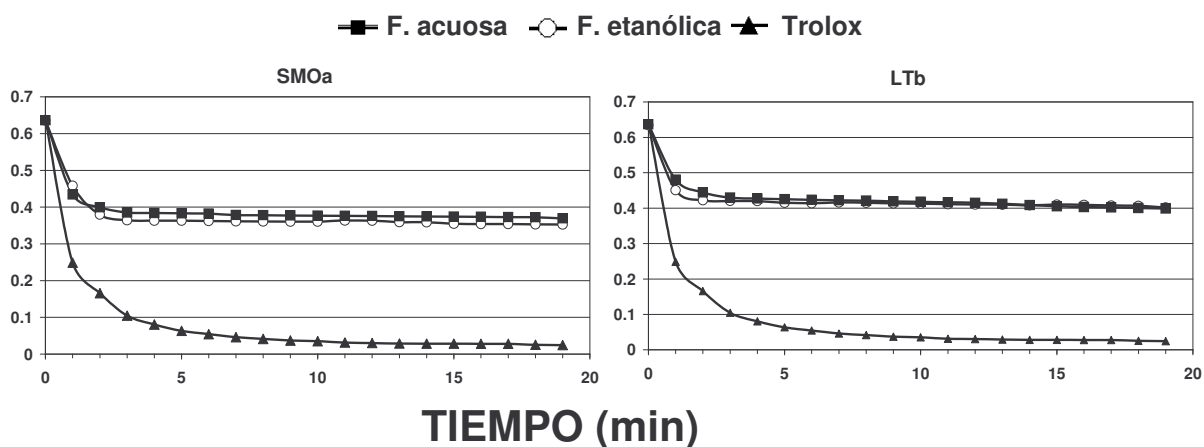
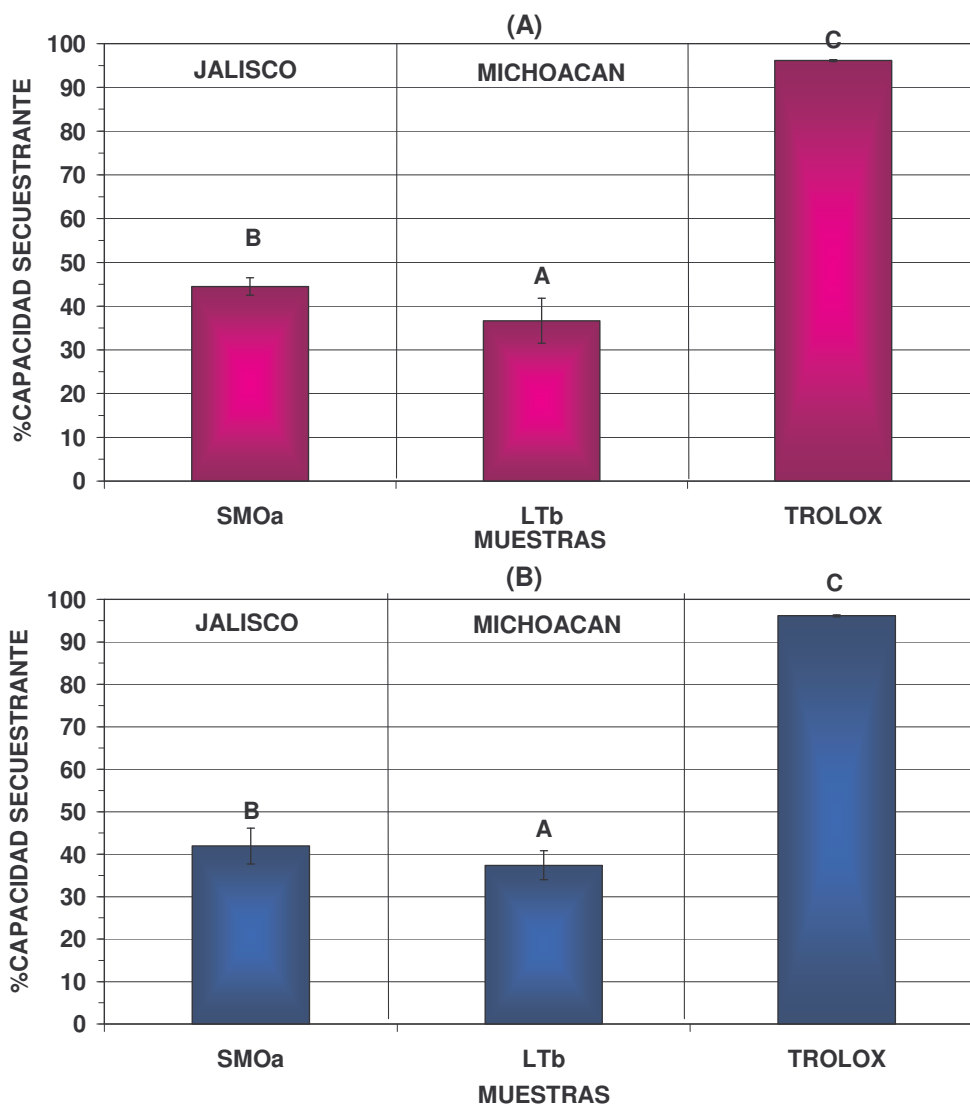


Figura 6.18. Cinética de actividad secuestrante por el radical DPPH de distintas muestras de suero

En la *Gráfica 6.15*. se observa que, tanto en la fracción etanólica como acuosa, la capacidad secuestrante de los compuestos polifenólicos presentes en el lactosuero, fueron estadísticamente diferentes entre sí y con el Trolox; sin embargo, se puede ver que la capacidad secuestrante no es despreciable (37-45% en la fracción etanólica y 37-45% en la fracción acuosa), por lo que esta actividad intermedia podría brindar otras opciones a los productores, como la posibilidad de elaborar otro tipo de productos a base de este suero.



Gráfica 6.15 Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH de distintas muestras de suero (A) Fracción etanólica y (B) Fracción acuosa

Es importante mencionar que los productores del queso Cotija utilizan el lactosuero para alimentación animal, por lo que los beneficios provenientes de los compuestos polifenólicos se verán reflejados en la salud del ganado; además, existen estudios que reportan que las vacas que consumen estos compuestos polifenólicos mejoran la producción de leche, lo que beneficiará al

productor. Por otro lado, si el ganado es de doble propósito, estos beneficios no solo se verán reflejados en la leche producida por el animal, sino que también se verá beneficiada la carne que se obtenga de él, generando beneficios tanto al productor (valor agregado) como al consumidor (actividad de los polifenoles). Así mismo, se observa que, en ambas fracciones, la actividad antioxidante en la muestra LT_b es menor que la que presenta la muestra SMO_a .

En resumen, se observa que no todos los compuestos polifenólicos provenientes de la leche se concentran en el queso, ya que durante su elaboración se pierde una cantidad de estos compuestos; por ejemplo, durante el desuerado, por lo que en el lactosuero, también contará con la presencia de polifenoles con actividad antioxidante. Dicha característica podría ser aprovechado por los productores para elaborar alimentos a base del suero, como bebidas ó quizá, emplearlo como ingrediente agregándolo a productos cárnicos, lácteos, de panadería, etc.

6.3.4.2. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS

Otro de los ensayos empleados para la determinación de la actividad antioxidante fue el del radical ABTS. Este radical es soluble en medios acuosos y orgánicos, por lo que permite medir la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica. Esta propiedad, en teoría, complementaría los resultados obtenidos en el ensayo anterior, ya que el radical DPPH se limitaba a los compuestos de naturaleza lipofílica.

En la *Figura 6.19*, se presenta la cinética de la capacidad secuestrante de los compuestos polifenólicos (200 ppm) presentes en los extractos crudos de queso sobre el radical ABTS, en donde se observa que la rapidez de la reacción es baja con respecto al Trolox, lo cual ya se había observado con el ensayo anterior.

A groso modo, en este ensayo podemos ver que, la rapidez de los polifenoles de la fracción acuosa es mayor a la rapidez de los compuestos en la fracción etanólica. Este comportamiento no logró observar en el otro ensayo, probablemente por la distinta naturaleza de estos ensayos.

Una diferencia que se puede resaltar con el método anterior y éste, es que en algunas muestras se sigue presentando un decremento en la absorbancia aún a los 20 minutos, quizá porque la reacción es lenta y el contenido de compuestos polifenólicos es el mismo.

En la *Grafica 6.16*, se observa que la capacidad secuestrante de los compuestos sobre el radical ABTS es mayor que sobre el radical DPPH, tanto en la fracción etanólica como en la fracción acuosa, pues se tiene un intervalo de capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de **61-69%** en la fracción etanólica y de **37-54%** en la fracción acuosa, lo que nuevamente nos indica que la actividad de los compuestos fenólicos no es despreciable con respecto al Trolox, pues en este ensayo, la actividad antioxidante puede representar hasta más del 50% con relación al estándar (Trolox)

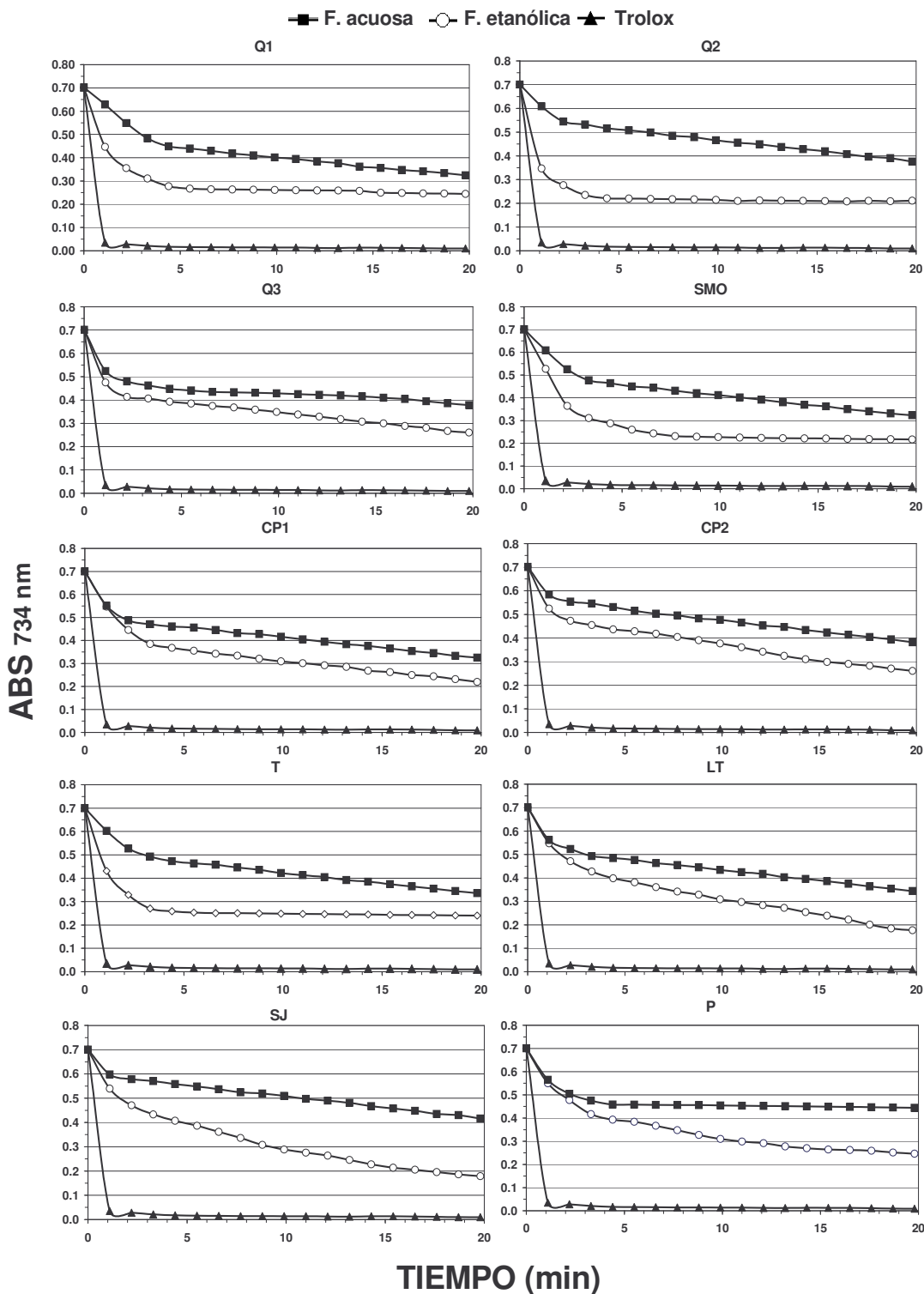


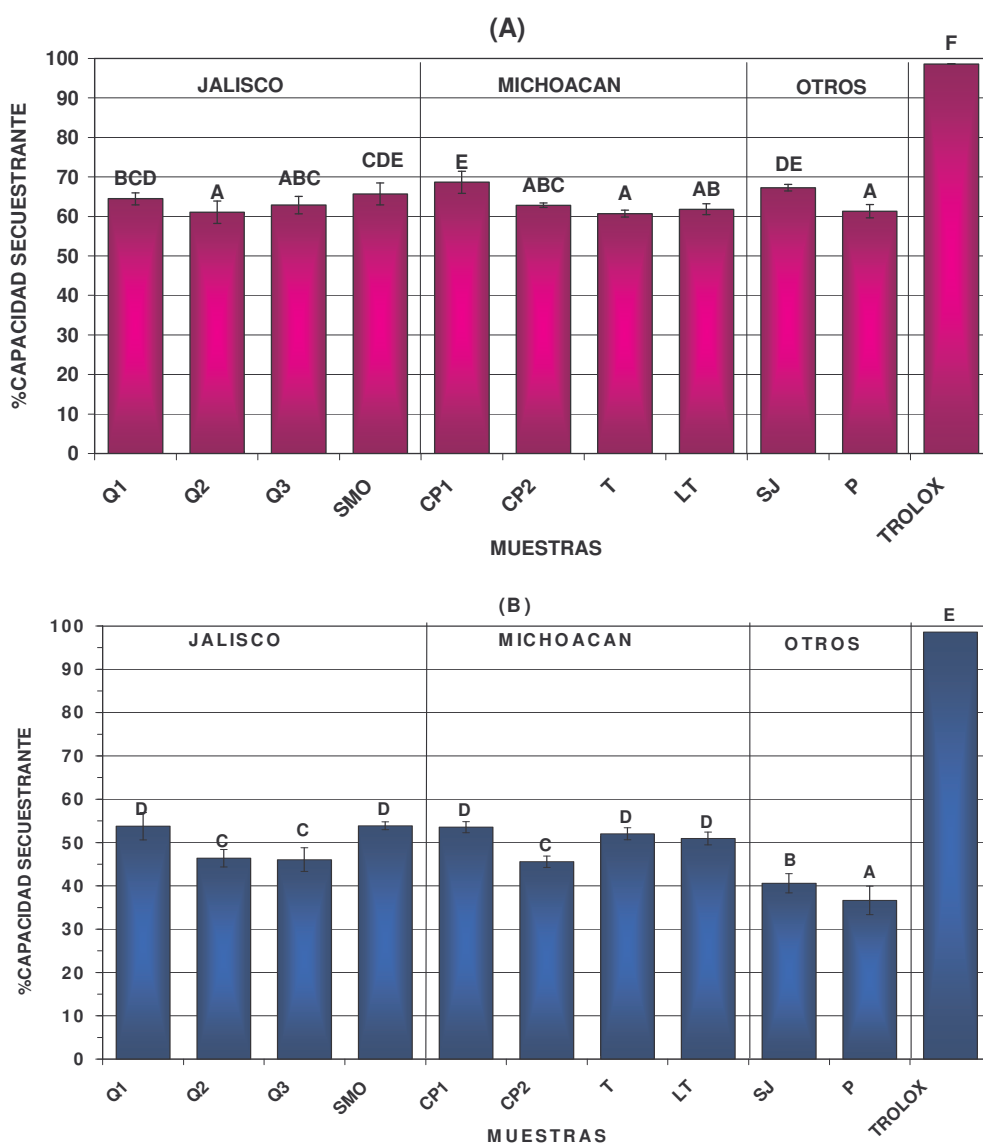
Figura 6.19. Cinética de actividad secuestrante por el radical ABTS de distintas muestras de queso

En esta misma gráfica, se observa que existen diferencias estadísticamente significativa entre algunas muestras, sin embargo existen muchas que no presentan estas diferencias. Por ejemplo,

la muestra SJ no presentó diferencias significativas con algunos quesos en la fracción etanólica pero si fue estadísticamente diferente a todas las muestras en la fracción acuosa.

La capacidad secuestrante de los compuestos polifenólicos, en la fracción etanólica de la muestra P no presentó diferencias significativas con otras muestras de queso como son con las muestras: Q₂, Q₃, CP₂, T y LT; sin embargo, la actividad de los polifenoles en la fracción acuosa presentó diferencias estadísticamente significativas con todos los quesos, lo que hace referencia a que la actividad antioxidante dependerá de la naturaleza de los ensayos y del tipo compuestos presentes debido a la alimentación, como ha sido discutido previamente.

Nuevamente, se observa que la zona de producción no presenta una relación con la capacidad antioxidante debido al área delimitada discutida anteriormente con el ensayo de DPPH.



Gráfica 6.16. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de distintas muestras de queso (A) Fracción etanólica y (B) Fracción acuosa

Al comparar la actividad antioxidante de las muestras de la región de Jalmich con el estudio de la actividad de un queso de Cabra (33.3%), podemos decir, que esta actividad es menor en el queso Cabra, lo que podría traducirse en mayores beneficios para el consumidor del queso Cotija. [31]

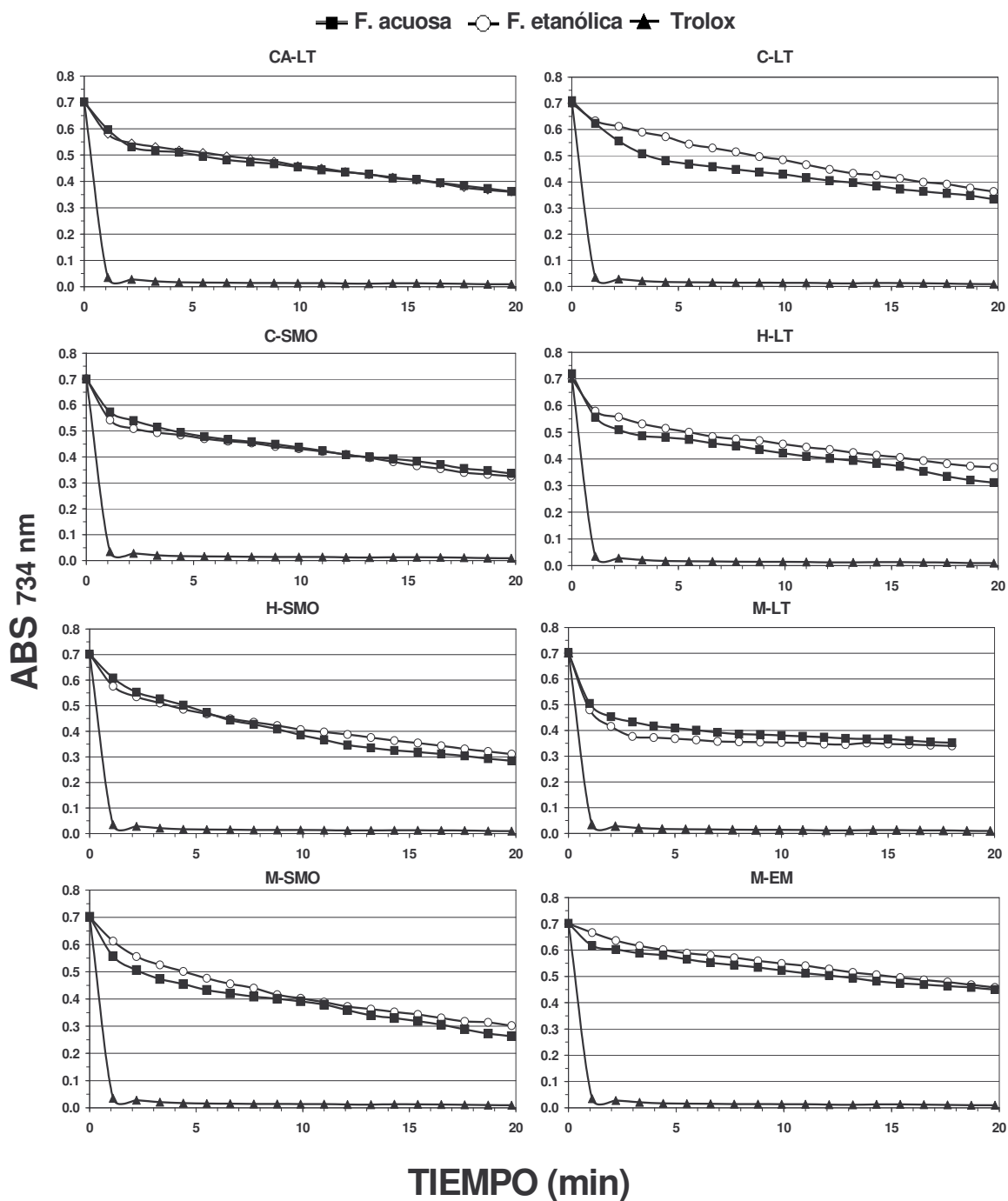
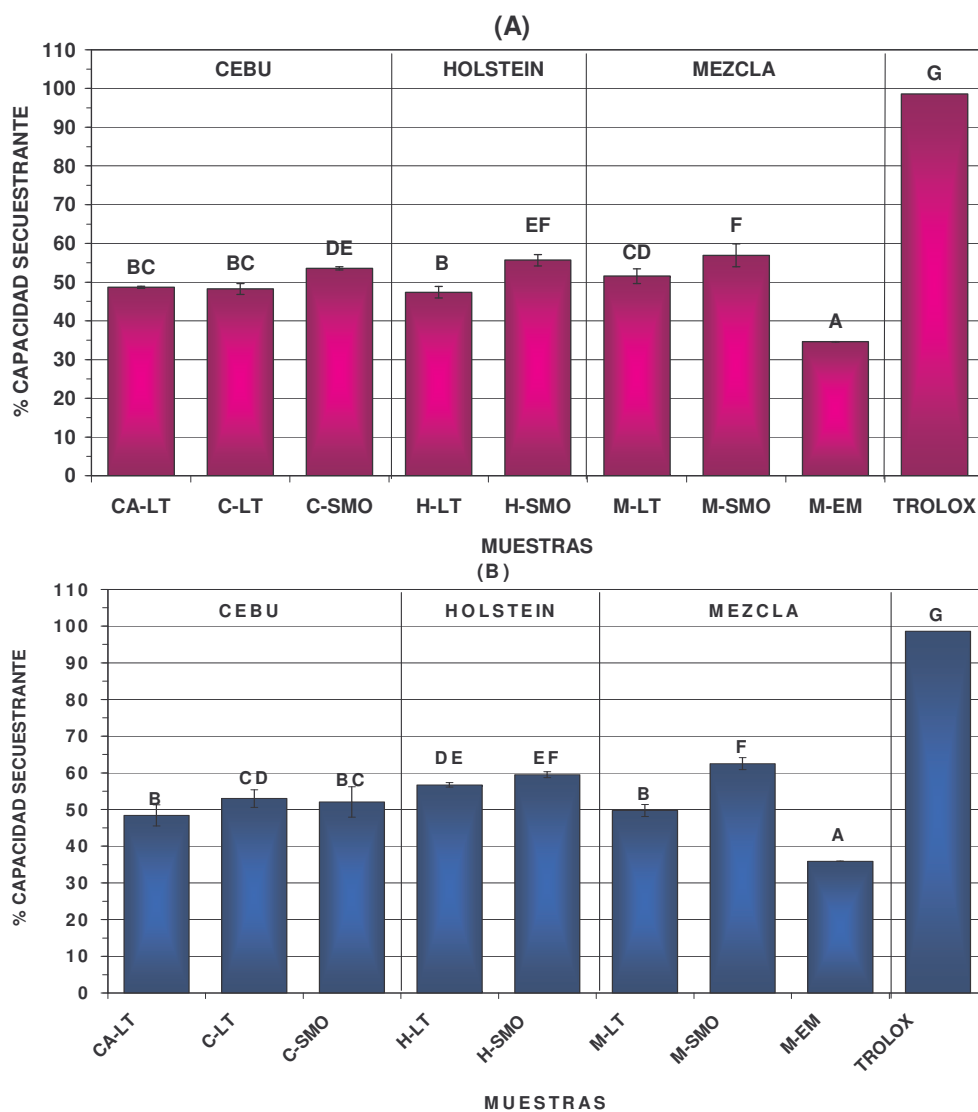


Figura 6.20. Cinética de actividad secuestrante por el radical ABTS de distintas muestras de leche

En el ensayo del radical ABTS, podemos observar que la capacidad secuestrante de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos crudos de la leche, presenta una rapidez de reacción baja (*ver Figura 6.20*), siendo ambas fracciones (etanólica y acuosa) similares.

Al igual que en el caso anterior, las muestras, siguen presentando capacidad secuestrante aún a los 20 minutos, lo que se entiende por efecto de la rapidez con la que están reaccionando los compuestos fenólicos con el radical.

En la *Gráfica 6.17.*, encontramos que el intervalo de la actividad secuestrante de las muestras de queso Cotija de la región de Jalisco se encuentran entre **47.4-56.9%** para la fracción etanólica y **48.4-62.5%** para fracción acuosa, lo cual indica que no son despreciables en comparación con el control.



Gráfica. 6.17. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de distintas muestras de leche (A) Fracción etanólica y (B) Fracción acuosa

En este ensayo, tampoco se observó una relación clara entre la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos y la zona de procedencia de las muestras, ni con el tipo de raza.

Finalmente, al comparar las mezclas de leche obtenida de ganado alimentado por libre pastoreo y la mezcla obtenida de ganado estabulado, se observó que esta última (M-EM) presentó una menor actividad que las muestras de ganado de libre pastoreo; y la muestra M-SMO, la que presentó la mayor actividad de todas las muestras analizadas.

En la *Figura 6.21*, se puede observar que la rapidez de la actividad secuestrante en los sueros es baja. La muestra LT_b fue la que presentó la rapidez más baja, por lo que, en general, a los 20 minutos de transcurrida la reacción todavía se encontró actividad secuestrante

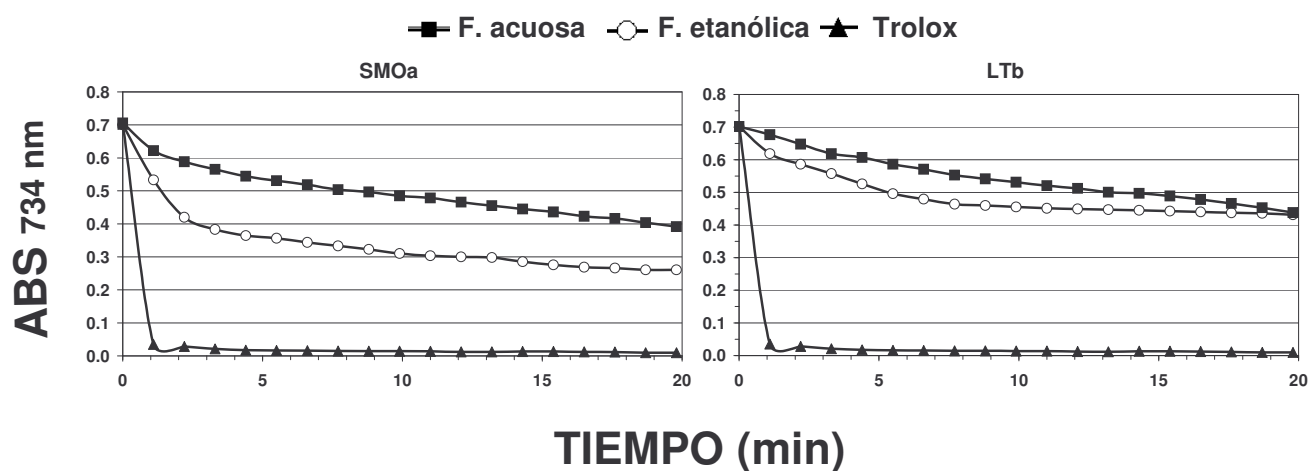
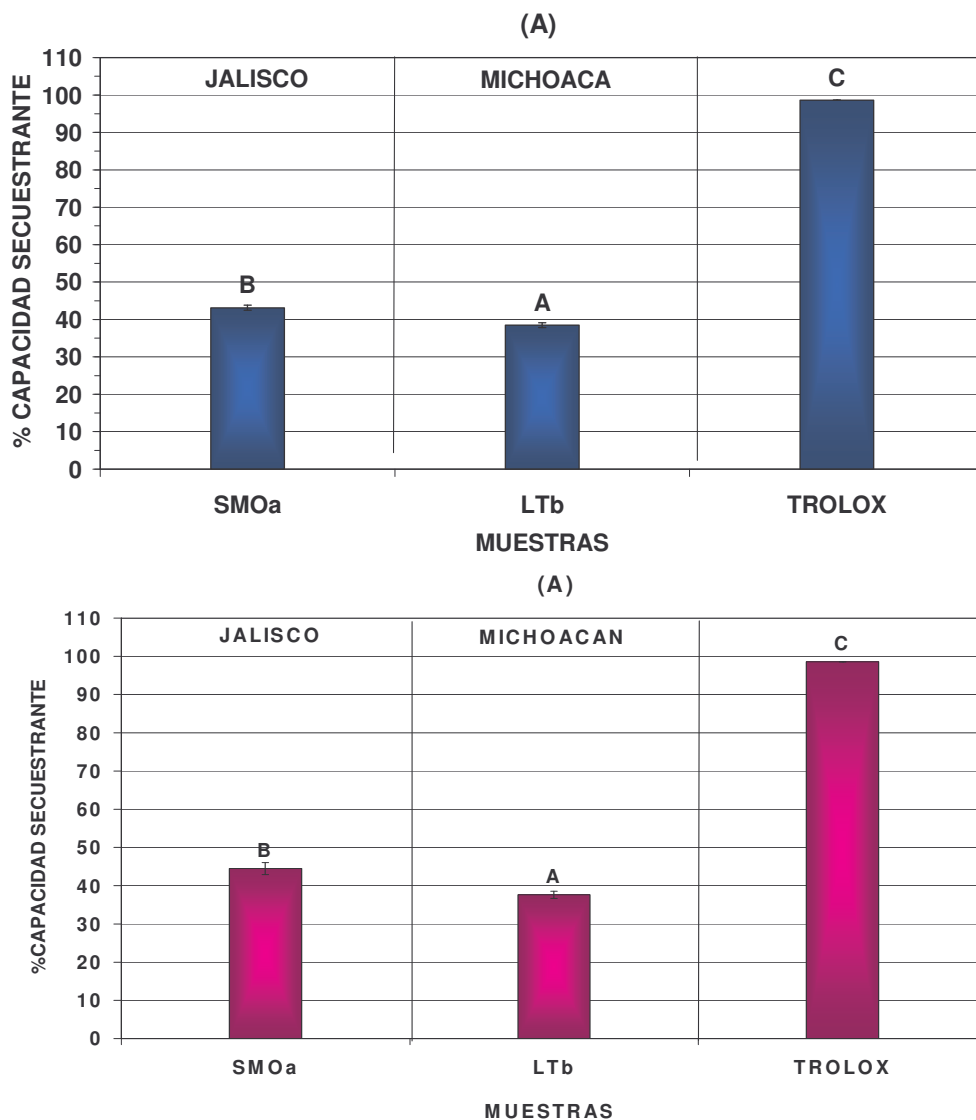


Figura 6.21. Cinética de actividad secuestrante por el radical ABTS de distintas muestras de suero

En la *Gráfica 6.18*, se observa que la capacidad secuestrante del suero, en ambas fases, es diferente estadísticamente con la actividad que presenta el Trolox. Sin embargo esta actividad no es despreciable con respecto al estándar de referencia.

La actividad encontrada en el suero SMO_a es mayor (43.1% fracción etanólica y 44.5% fracción acuosa) respecto a la actividad de la muestra LT_b (38.5% fracción etanólica y 37.6% fracción acuosa) siendo estadísticamente diferente entre sí, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el ensayo con el radical DPPH



Gráfica. 6.18. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS de distintas muestras de suero (A) Fracción etanólica y (B) Fracción acuosa

Existen diversos estudios en los que se ha encontrado una actividad antioxidante mayor a la de las muestras analizadas en este trabajo, como el brócoli, distintas bayas, cáscara de papa, cáscara de remolacha, (78,86,85,98%, respectivamente); incluso con estándares como BHA y BHQ (85 y 92%, respectivamente). Así mismo, podemos encontrar una actividad similar o menor de los polifenoles presentes en las muestras que la presente en la hojuelas de avena, salvado de trigo, espinaca, pimiento, (20,35,67,77.63 %, respectivamente), a pesar de que todos estos resultados fueron realizados a 500 ppm. [56]

Aunque también podemos encontrar que las muestras analizadas pueden presentar una actividad mayor si la comparamos con la calabaza (18.8% actividad). [122]

Todas estas diferencias, se pueden atribuir a que la matriz de estudio de los vegetales, frutas, cereales, etc., es diferente; además en el caso del queso Cotija, el rumiante es un intermediario en el metabolismo de estos compuestos fitoquímicos, por lo que su concentración puede variar en el producto final.

En resumen, la actividad antioxidante encontrada en las muestras depende de los compuestos fenólicos presentes en las plantas de las que se alimenta el ganado, es decir, está relacionado con el grado de hidroxilación de los compuestos fenólicos, la sustitución por azúcares y la forma en la que se encuentran éstos, ya que hay que recordar que la forma glicosidada, presentan menor actividad que sus correspondiente agliconas. [59]

Además, es importante mencionar que a pesar de las bajas concentraciones de compuestos fenólicos en el queso en comparación con otros alimentos, éstos presentan una actividad antioxidante apreciable, que puede tener gran impacto en la conservación del queso y/o en la salud del consumidor. [80]

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Con el estudio realizado podemos concluir varios aspectos:

- ★ Se logró establecer una propuesta de la composición química promedio del queso Cotija Región de Origen oreado, con la que nos damos cuenta que por las características que posee, como la alta concentración de materia grasa, alta concentración de proteína y alto porcentaje de cloruros, lo hacen un queso único y muy apreciable para el consumidor.
- ★ Se recomienda a los productores estandarizar su proceso de elaboración desde la materia prima empleada; así como en las etapas de elaboración de este queso, principalmente en la operación de cortado, salado, prensado y, finalmente, la etapa de maduración.
- ★ La calidad del queso Cotija no sólo se caracteriza por su aporte nutrimental, también se caracteriza por las propiedades fisicoquímicas que presentan como la baja actividad acuosa, lo que brinda la seguridad alimentaria del consumidor.
- ★ Debido al tipo de alimentación y raza del ganado con que se elabora el queso, podemos encontrar compuestos polifenólicos en la leche con la que se produce y por consiguiente en el queso Cotija Región de Origen, los cuales presentan cierta actividad antioxidante lo que podría dar un valor agregado al producto.
- ★ El Cotija Región de Origen presentó compuestos polifenólicos en mayor concentración y con mayor actividad antioxidante que lo reportado en un estudio de queso de cabra por lo que el queso Cotija sería una mejor opción para el mantenimiento de la salud del consumidor.
- ★ Durante el proceso de elaboración del queso, se pierden polifenoles con actividad antioxidante en el desuerado, por lo que el lactosuero obtenido podría ser empleado no solo para alimentación animal, sino también como ingrediente de otro tipo de productos como bebidas lácteas, yogurt, quesos, postres, etc.
- ★ Por las características que presenta el queso Cotija del mercado de San Juan, podemos pensar que fue elaborado en la región o cerca de la región serrana entre los estados de Jalisco y Michoacán aunque con un tiempo de maduración diferente. Además de que se lograron identificar compuestos fenólicos con actividad antioxidante similar a la evaluada en las muestras de queso Cotija auténtico.
- ★ De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra de queso doble crema, podemos decir que no se parece ni química, ni fisicoquímicamente al queso Cotija Región de Origen. Además de que el tipo de alimentación del ganado con que se elaboró este queso, proporcionó compuestos polifenólicos con una actividad antioxidante menor que la encontrada en el queso Cotija.

- ★ Finalmente, con la investigación de campo y con el análisis químico realizado podemos darnos cuenta de la riqueza de los productos artesanales con los que cuenta nuestro país, desde el punto de vista nutricional, funcional, económico e histórico que al igual que el queso Cotija necesitan ser rescatados y/o apoyados.

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS

Para complementar este estudio sobre el queso Cotija desde el punto de vista químico, sería importante:

- ★ Realizar un estudio sobre el tipo de alimentación del ganado y el impacto que tiene sobre la materia prima, el subproducto y el queso controlando algunas variables (por ejemplo, razas, periodo de lactancia, tipo y cantidad de alimento consumido, etc) y compararlo con ganado de la misma región que se alimente mediante el sistema estabulado.
- ★ Realizar un estudio en el queso Cotija Región de Origen después de la estandarización del proceso con las recomendaciones mencionadas en este trabajo, monitoreando los cambios que se presentan desde la materia prima hasta el producto final, siendo este último evaluado desde que se encuentra fresco hasta que esta madurado (por ejemplo, monitoreo por 12 meses)
- ★ Realizar un estudio sobre los componentes funcionales y nutrimentales del queso Cotija para contar con mayor información sobre este queso de interés por el consumidor (perfil de ácidos grasos, colesterol, aminoácidos, vitaminas, compuestos fenólicos, aporte calórico, etc.)
- ★ Trabajar sobre la elaboración de una norma que respalde a este queso, por su riqueza cultural, nutricional y sensorial, puesto que en la NOM-121-SSA1-1994, solo se hace mención de este queso en lo que respecta a los aspectos sanitarios que debe cumplir el producto; además de que esta norma no es aplicable para productos elaborados con leche bronca como es el caso del Cotija Región de Origen.

ANEXO A. PRODUCCIÓN NACIONAL DE LECHE

En México, según la SAGARPA, la producción total de leche fue de millones de litros durante el periodo 2002-2006.

En la *Tabla B.1*, se muestra como la producción de leche ha aumentado en el transcurso de los años, con una baja en el 2006, lo que afecto a la industria láctea.

Tabla B.1. Producción nacional de leche de vaca (SIAP-SAGARPA, 2006)

Año	2002	2003	2004	2005	2006
	Millones de litros				
Leche	9,804.8	9,936,197	10,025.3	10,032.5	9,320.7
Bovino	9,658.3	9,784.4	9,864.3	9,868.3	9,171.1

Dicha producción total se concentró en cinco estados principalmente, que contribuyeron conjuntamente con el por ciento de la producción nacional, destacando se Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua. Este dato es importante si consideramos que Jalisco es uno de los estados en donde es elaborado el queso Cotija.

En la *Tabla B.2*. se observa que en los últimos años, el estado de Jalisco ha disminuido su producción de leche , lo cual esta relacionado con el retraso o la falta de lluvias, aspecto que ha influido en la producción de queso y principalmente el Cotija, ya que las lluvias son un factor fundamental para poder alimentar al ganado que secreta la leche para producir el queso.

Tabla B.2. Principales estados de mayor producción de leche (SIAP-SAGARPA, 2007)

Año	2003	2004	2005	2006
Estado	Miles de litros			
Chihuahua	801, 955	780, 000	812,608	785,316
Coahuila	1 058, 712	1 082,802	1,126,352	1,228,394
Durango	953, 315	940,835	948,120	992,834
Jalisco	1 712,562	1 722,500	1,714,426	1,712,462
Veracruz	720, 426	719, 217	720,187	675,300

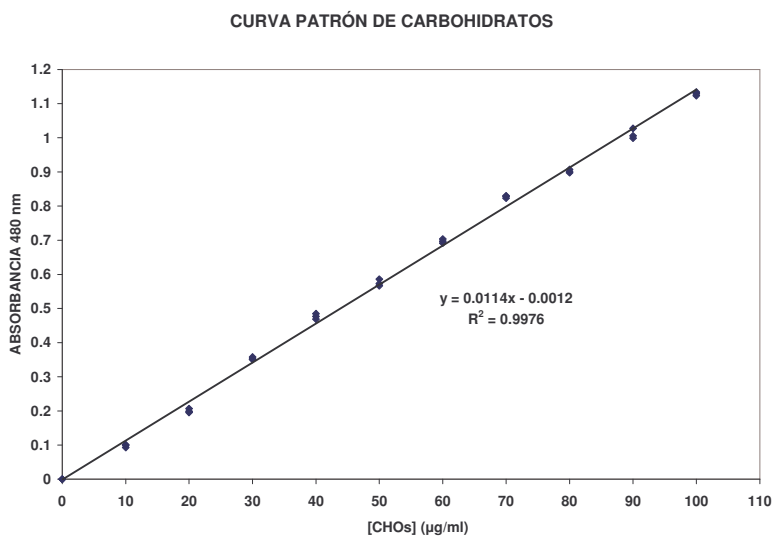
ANEXO B. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE LECHE

SISTEMA	RAZAS	CARACTERÍSTICAS	ESTADOS
Especializado	Holstein, Jersey y Pardo Suizo	Gran productividad. Industria procesadora más moderna y dinámica. Alta tecnología y la comercialización.	Coahuila, Durango, Chihuahua, Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, Estado de México, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro y Baja California
Semi-especializado	Holstein y Pardo Suizo	Nivel de producción menor al especializado. Ordeña manual. Carece de equipo propio para refinamiento y conservación. La alimentación del ganado es de pastoreo y forrajes en pequeñas extensiones de terreno.	Baja California, Colima, Chihuahua, Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala y Zacatecas.
Traspatio	Cruzas entre Cebú, criollo y sus cruzas con Holstein y Pardo Suizo	Alimentación del ganado basada en pastoreo en pequeñas superficies de terreno. Productores sin capacitación. Acceso limitado al crédito. Instalaciones rudimentarias. Nivel tecnológico bajo. Ordeña manual. Deficiencias de control sanitario en la producción y a la tecnología.. La producción es para autoconsumo y en ocasiones para venta directa al público.	Principalmente en el trópico húmedo y semihúmedo (T=30-40 °C, HR=90-95%, 700 mm precipitación anual) Jalisco, Edo. De México, Michoacán, Hidalgo, Sonora y en menor grado, Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Chihuahua, Distrito Federal, Durango y Nuevo León.
Doble propósito	Cebuínas y cruzas con Suizo, Holstein y Simmental	Obtención de leche y carne con pastoreo en praderas naturales o inducidas. Productividad baja. Ordeña manual. Problemas de calidad, conservación, colecta y comercialización de la leche.	Regiones tropicales del país. Principalmente, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Guerrero, Guanajuato, Tabasco, Zacatecas, Nayarit, San Luis Potosí y Tamaulipas.

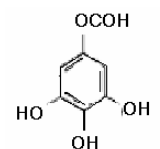
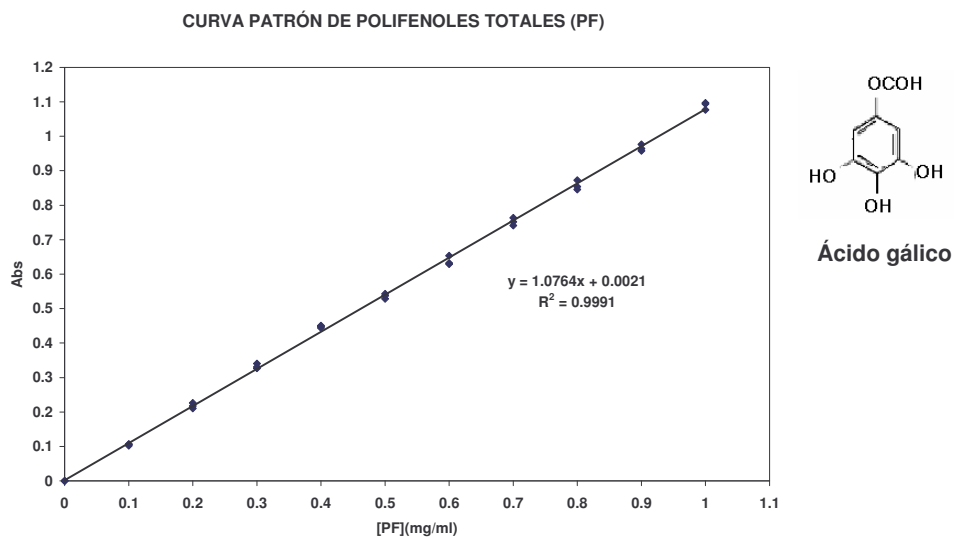
FUENTE: (Villegas, 2000), <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/>

ANEXO C. CURVAS PATRÓN.

La curva patrón para la determinación de carbohidratos fue diseñada de acuerdo a lo estipulado en el método de Fenol-Sulfúrico, la cual se muestra a continuación:



La curva patrón para la determinación de polifenoles totales fue diseñada de acuerdo a lo estipulado en el método de Folin-Ciocalteu, la cual se muestra a continuación:



Ácido gálico

BIBLIOGRAFÍA

1. Aerts, R., et al. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 75:1-12.
2. Alais, C. (1985). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. *Reverte, S.A.* España, pp. 21-205.
3. Álvarez R., et al. (2005). Reglas de uso. Marca Colectiva: Queso *Cotija Región de Origen*, pp. 1-24
4. Alviárez, A., et al. (2002). Tendencias en la Producción de Alimentos: Alimentos Funcionales. *Salud Pública y Nutrición*, 3: 3-13
5. Amiot, J. (1991). Ciencia y tecnología de la leche. *ACRIBIA*. Zaragoza, pp 1-69, 97, 249-266.
6. Anagnostopoulou, M., et al. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94:19-25.
7. AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. *William Horwitz*. 20th edition, 1975. Chapter 3, parts. 3.067, 3.068 y 3.070.
8. Araya, H., et al. (2003). Alimentos funcionales y saludables. *Rev. Chil. Nutr.*, 30(1) 8-14.
9. Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11:419-421.
10. Avalos, K., et al. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en vinos de origen nacional. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE*, pp. 1-4
11. Bain, I., et al. Elaboración de Quesos Artesanales con Leche de Oveja. *INTA Chubut*, pp. 208-211.
12. Balasundram, N. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:91-203
13. Bao, H., et al. (2004). Effects of heating and addition of seasoning on the anti-mutagenic and anti-oxidantive activities of polyphenols. *Food Chemistry*, 86:517-524.
14. Beresford, T., et al. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Inter. Dairy Journal*, 11:259-274.
15. Bernal, F. (1992). Trabajo monográfico de actualización: Quesos elaborados tradicionalmente en México y clasificación propuesta. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*, pp. 5,8,19,22,36-39,45 y 50.
16. Bocco, A., et al. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem*, 46: 2123-2129.
17. Bortolomeazzi, R., et al. (2006). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*.
18. Boskou, G., et al. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94: 558-564.
19. Brand, W., et al. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u- Technol.*, 28:25-30.
20. Buesa, C., et al. (2006). Desarrollo de la alimentación funcional en Cataluña Barcelona, *CIDEM*, pp 1-58.

21. Cadaval, A., et al. (2005). Alimentos funcionales. Para una alimentación más saludable. *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria*, pp. 5-48.
22. Calligaris, S., et al. (2004). Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*, 14:421-427.
23. Carroll, S., et al. (2006) .Milk composition of Holstein, Jersey and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. *Animal Feed Science and Technology*, 131: 451–473.
24. Cerklewski & Ridlington, (1987). Chloride determination in food with ion-selective electrode after isolation as hydrogen chloride. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70: 924–926.
25. Cervantes, F., et al. (2006). Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar. III Congreso Internacional de la Red SIAL .“Alimentación y Territorios”
26. Cevallos-Casals, B., et al. (2006). Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry*, 96:273-280.
27. Chasquibol, N., et al. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Rev. Per. Quim. Ing. Quim.*, 5(2):9-20.
28. Chen, J., et al. (2003). Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13:927-935.
29. Chidambara, K., et al. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) Pomace extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 50:5909-5914.
30. Cozzolino, V. (2000). Alimentos funcionales. *Fármacos & Medicamentos*.
31. Cuchillo, M., et al. (2006). Componentes funcionales y nutrimentales del queso fresco de leche de cabra, cruda y pasteurizada por efecto del sistema de alimentación. Tesis de maestría. UNAM.
32. Dimitreli, G. (2007). Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *Journal of food engineering*, 79:1364-1373.
33. Djeridane, A. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medical plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*,97:654-660.
34. Dubois, M., et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3):350-356.
35. Dueñas, M., et al. (2003). Phenolic composition and antioxidant activity of mocan seeds (*Visnea mocanera* L.f.). *Food Chemistry*, 82:373-379.
36. Elgersma A., et al. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Sci. and Technol* 131: 207–225.
37. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37:277-285.
38. Erlund, I., et al. (2004) .Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin: Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851–874.
39. Fekadu, B., et al.(2005). Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheese. *Small Ruminant Research*,59: 55-63.

40. Fiuza, S., et al. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties -a structure- activity relationships study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12:3581-3589.
41. Forgacs, E. & Cserhati, T. (2002). Thin-layer chromatography of natural pigments: New advances. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 1521-1541.
42. Fox, P. et al.(2000). Fundamentals of cheese science. *An Aspen Publication*. Gaithersburg Maryland, pp.19-43,153-6.
43. Frances, R., et al. (1992). Texture of hard cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 3:160-164.
44. Franz, C., et al. (2003) Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88: 105– 122
45. García, V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. *Tesis de Licenciatura. Facultad de química. UNAM*,
46. Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 163-171
47. Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88:215– 222
48. Goli, A., et al. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92: 521-525.
49. Gompertz, G. (2004) Elaboración y comercialización de queso de leche de oveja en el secano mediterráneo de la VI región de Chile. Estudio y evaluación de alternativas. Tesis de maestría en Ciencias Animales. *Pontificia Universidad Católica de Chile*, pp 1-154.
50. Gutierrez, A. (2002). Vino, polifenoles y protección a la salud. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 16(2): 134-141.
51. Halsted, C. (2006). Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77:1001S-1007S.
52. Hasler, C. (2006). Functional foods: Benefits, concerns and challenges- A position paper from the american council on science and health. *The Journal of Nutrition*, 132:3772-3781.
53. Hernández, M., et al. (1999). Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 18(1):12-14.
54. Hotta, H., et al. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572:123-132.
55. Ismail, A., et al. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.*, 87:581-586.
56. Kähkönen, M., et al.(1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47:3954-3962.
57. Kim, J., et al. (1991). Contributions of cow, sheep and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *J. Dairy Sci.*, 74:3267-3274.
58. Kim, M., et al. (2005). Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. Fruits and their antiradical properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:789-802.
59. Kuskoski, E., et al. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 24: 691-693.

60. Kuskoski, E., et al. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 25 (4): 726-732.
61. Lau, F., et al. (2005). The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of aging*, 26S:S128-S132.
62. Liu, X., et al. (2006). Total phenolic content and DPPH* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT*, pp. 1-6.
63. López A. (2005). Alimentos funcionales: salud a la carta. ¿Cómo ves?. *Revista de divulgación de la ciencia*, 42:10-14.
64. Lu, Y. & Foo, L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75:197-202.
65. Luquet, F. (1993). Los productos lácteos. Transformación y tecnologías. *ACRIBIA*. Zaragoza, 2:3,89,287-291.
66. Luquet, M. (1991). Leche y productos lácteos. Vaca-oveja-cabra. *ACRIBIA*. Zaragoza, 1: 5-11, 124-174.
67. Marvan, L., et al. (s/f). Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. 2^{da} edición. Fomento de Nutrición y Salud A.C.
68. Martínez, I, et al. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1):1-15.
69. Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50:3444-3452.
70. Milardovic, S., et al. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68:175-180.
71. Milci, S., et al. (2005). Chemical, microbiological and sensory characterization of Halloumi cheese produced from ovine, caprine and bovine milk. *International Dairy Journal*, 15:625-630.
72. Moure, A., et al. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72:145-171
73. Naczki, M, et al. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 1-20.
74. Nieto, Z. & Cañizos, M. (2004). Manual de prácticas de Laboratorio. Productos Lácteos. *Depto., de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, UNAM*, pp. 7-8, 17-18, 23.
75. Norma Mexicana. NMX-F-098-1976. Determinación de Proteínas en Quesos. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial
76. Norma Mexicana. NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial
77. Norma Mexicana. NMX-F-111-1984. Alimentos-Lácteos-Determinación de Sólidos Totales en Quesos. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
78. Norma Mexicana. NMX-F-206-1986. Alimentos. Lácteos. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo.
79. Norma Mexicana. NMX-F-701-COFOCALEC-2004. Sistema de productos de la leche. Alimentos Lácteos. Determinación de cenizas en quesos. Método de prueba.

80. Norma Mexicana. NMX-F-83-1986. Alimentos-Determinación de Humedad en Productos Alimenticios. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial
81. Norma Oficial Mexicana. NOM-F-100-1984. Alimentos-Lácteos-Determinación de Grasa Butírica en Quesos Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
82. Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos frescos, madurados y procesados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
83. O'Connell, J. (2001). Significance and applications of phenolics compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11:103-120.
84. Ong, L., et al. (2005). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. Case*, *Lb. Paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*, 16:446-456.
85. Osawa, T. (1999). Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mechanisms of ageing and development*, 111:133-139.
86. Osman, A., et al. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36:321-329.
87. Pearson D. (1993). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. *ACRIBIA*. 2° reimpresión. Zaragoza, pp. 41, 55-56, 64-69, 83, 85, 169-171.
88. Pérez & Lima. (1989). Determinación potenciométrica de sal en alimentos. *Alimentaria* 205: 57-67.
89. Peschel, W., et al. (2006). An Industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetables and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97:137-150.
90. Pineda, D., et al. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev. Cubana Aliment. Nutri.*, 13(2): 104-111.
91. Prados, F. et al. (2006). Influence of the frozen storage on some characteristics of ripened Manchego-type cheese manufactured with a powdered vegetable coagulant and rennet. *F. Chemistry*, 95:677-682.
92. Prieto, B., et al. (2002). Compositional and physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of Leon raw cow's milk cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15:725-735.
93. Prieto, B., et al. (2000). "Quesucos de Liebana" cheese from cow's milk: biochemical changes during ripening. *Food Chemistry*, 70:227-233.
94. Re, R., et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26:1231-1237.
95. Rice, C., et al. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plants science*, 2(4):152-159.
96. Riezzo, G., et al. (2005). Functional foods: Salient features and clinical applications. *Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5:331-337.
97. Robards K., et al. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.
98. Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000:657-691.

99. Rodrigo, R., et al. (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142:317-327.
100. Rosch, D., et al. (2003). Structure-Antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea Buckthorn juice. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4233-4239.
101. Rossetti, L & Descalzo, A. (2005). Actividad antioxidante en leche vacuna de tambos argentinos y su variación estacional. *Centro de investigaciones de agroindustria*.
102. Sablani, S., et al. (2007) . Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*, 78:266-271.
103. Sakihama, Y., et al. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177:67-80.
104. Sanjuán, E., et al (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, 78:281-289.
105. Santos, A. & Villegas, A. (1997). El queso Cotija. Propuesta para su fabricación a partir de leche pasteurizada. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*, 12(3): 7-11.
106. Saura F. (1998). Antioxidant Dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem.*, 46:4303-4306
107. Saurel, R. (2004). Modelling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods. *Journal of Food Engineering*, 63:163-170.
108. Scalbert, A. (2005). Dietary polyphenols and prevention of diseases. *Taylor & Francis*, 45:287-305.
109. Schlimme E. (2002). La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas. *ACRIBIA*. Zaragoza, pp. 1-15, 33-36, 77-81,87-94.
110. Scott, R. (1991). Fabricación de quesos. *ACRIBIA*. Zaragoza, pp.1-37
111. Sedó, P., et al. (2001). Alimentos funcionales: análisis general acerca de las características químico - nutricionales, desarrollo industrial y legislación alimentaria *Rev. Costarric. Salud Pública*, 10: 18-19.
112. Sensoy, I., et al. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 99:388-393.
113. SERNAC. (2004). Alimentos funcionales. *Servicio Nacional del consumidor*, pp. 1-23.
114. Sharma, O., et al. (1998). Thin-layer Chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *Journal of Chromatography A*, 822:167-171.
115. Silva, E. et al. (2003). Revisión: alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(4):1-8.
116. Silva, E., et al. (2006). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, pp. 1-7.
117. Soobrattee, M., et al. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579:200–213.
118. Soong, Y. & Barlow, P. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88:411-417.

119. Srivastava, S. (2006). Antioxidant activity of the roots of *Decalepis Hamiltoni* (Wight & Arn). *LWT*, 39:1059-1065.
120. Stanton, C. (1998). Probiotic cheese. *Int. dairy Journal*, 8:491-496.
121. Tsao, R. & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812:85-99.
122. Turkmen, N. et al. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93:713-718.
123. Turkmen, N. et al. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99:835-841.
124. Utrera, M. (2007). Queso Cotija auténtico: Estudio de la relación de sus características sensoriales, texturales de color. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
125. Valenzuela, A., et al. (2003). Antioxidantes naturales en alimentos funcionales: de la seguridad alimentaria a los beneficios en la salud. *Grasas y aceites*, 54: 295-303.
126. Valls, V. (s/f). El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal. *Facultad de Medicina. Universidad de Valencia*, pp. 1-9.
127. Varnam, A., (1995). Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. *ACRIBIA*. Zaragoza, pp. 1-28,167-189, 291-349.
128. Vasconcellos, J. Alimentos Funcionales. Conceptos y Beneficios Para la Salud . *Depto. de Ciencias de Alimentos y Nutrición. Universidad Chayman, USA*.
129. Villaño, D., et al. Antioxidant activity of wines determined by the ABTS ^{•+} method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64: 501-509.
130. Villegas de Gante, A. (2000). Tecnología quesera. *Trillas*, pp. 13-53, 76-87, 316-324.
131. Watkinson, P., et al. (2001). Effect of cheese pH and Ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11:455-464.
132. Wong, N. (1999). Fundamentals of dairy chemistry. An Aspen Publication. Gaithersburg, pp. 1-39.
133. Zhou, K. & Yu, L. (2006). Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT*, 39:1155-1162.
134. Zúñiga, A. (2007). Primer estudio descriptivo de la microbiota del queso Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM (en proceso).

Páginas de Internet

135. Anuario pecuario. Leche de vaca. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdetpec.html
136. Enciclopedia de los Municipios de Michoacán disponible en <http://www.michoacan.gob.mx/municipios/19cotija.htm>
137. Eligen al queso de Cotija, Michoacán, como el mejor del mundo este año disponible en <http://www.jornada.unam.mx/2006/11/14/index.php?section=estados&article=037n3est>