

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL



***USO "EXTRA-LABEL" DE ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS EN
GANADO CAPRINO LECHERO. DETECCIÓN DE RESIDUOS EN LA LECHE
Y EL QUESO DE CABRA***

TRABAJO FIN DE GRADO EN:

Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

ALUMNO: M^a Carmen Beltrán Martínez

TUTOR: Prof. D. Cristòfol Peris Ribera

COTUTOR: Prof. D^{ña}. M^a Pilar Molina Pons

Curso Académico: 2016-2017

Valencia, Diciembre de 2016



Este trabajo forma parte del proyecto “Trazabilidad de la presencia de antibióticos en leche, queso y lactosuero de cabra” (AGL2013-45147-R) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad

USO “EXTRA-LABEL” DE ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS EN GANADO CAPRINO LECHERO. DETECCIÓN DE RESIDUOS EN LA LECHE Y EL QUESO DE CABRA

RESUMEN

La utilización de antibióticos para el tratamiento de la mamitis y otras enfermedades de tipo infeccioso en ganado caprino lechero es una práctica generalizada actualmente. Sin embargo, la escasa disponibilidad de medicamentos registrados para esta especie hace que en muchas ocasiones, los veterinarios se vean obligados a aplicar los tratamientos de forma “extra-label”, lo que incrementa el riesgo de la presencia de residuos de antibióticos en la leche y sus derivados.

El objetivo de este trabajo es verificar si el uso “extra-label” de antibióticos macrólidos en caprino lechero puede generar residuos en la leche y afectar la seguridad de productos derivados como el queso. Para ello se seleccionó un macrólido de uso habitual en caprino lechero, la tilosina, y se planteó la realización de un experimento *in vivo* que simulara las condiciones de su aplicación a nivel de campo y el aprovechamiento industrial de la leche procedente de los animales tratados, para la obtención de queso curado tipo Tronchón. El antibiótico residual en la leche y el queso de cabra, fue determinado por HPLC. También se realizaron análisis de tipo fisicoquímico sobre el queso a diferentes tiempos de maduración, con objeto de identificar posibles defectos de fabricación asociados con la utilización de la leche procedente de este tipo de tratamientos.

La leche de cabra ordeñada tras la administración del antibiótico, presentó una concentración residual de tilosina de $198,7 \pm 57,8$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, valor muy superior al LMR establecido en la legislación para esta sustancia (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Además, los quesos obtenidos a partir de esta leche, presentaron una concentración relativamente elevada de antibiótico residual a lo largo de todo el periodo de maduración (día 1: $178,9 \pm 3,3$ $\mu\text{g}/\text{kg}$; día 30: $140,9 \pm 11$ $\mu\text{g}/\text{kg}$; día 60: $86,85 \pm 4,74$ $\mu\text{g}/\text{kg}$), así como algunas alteraciones de su calidad, principalmente relacionadas con la textura y grado de proteólisis alcanzado durante la fase de curado. Por el contrario, tras el periodo de supresión de 7 días, los residuos de tilosina en la leche ordeñada (< 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fueron inferiores al LMR establecido y el procesado de esta leche no generó residuos detectables en los quesos obtenidos.

Sin embargo, aunque estos resultados indican que la aplicación “extra-label” de tilosina, en las condiciones descritas en este trabajo, generan una concentración de antibiótico residual en la leche relativamente baja, podría suponer un riesgo para la salud de los consumidores, en determinadas circunstancias. Por ello, la realización de estudios similares con otras sustancias de este grupo de antibióticos sería recomendable, para poder valorar la inocuidad de las prácticas veterinarias en relación a la aplicación “extra-label” de estas sustancias.

Palabras clave: antibióticos, caprino lechero, leche de cabra, queso

Alumno: Dña. M^a Carmen Beltrán Martínez

Valencia, diciembre de 2016

Tutor Académico: Prof. D. Cristòfol Peris Ribera

Cotutor: Prof. Dña. M^a Pilar Molina Pons

OFF-LABEL USE OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN DAIRY GOATS. DETECTION OF RESIDUES IN MILK AND GOAT'S MILK CHEESE

ABSTRACT

The use of antibiotics in the treatment of mastitis and other infectious diseases in dairy goats is a widespread practice nowadays. However, the limited availability of drugs registered for this species is forcing veterinarians to employ the off-label treatments increasing the risk of drug residues in milk and dairy products.

The aim of this work is to verify if the off-label use of the macrolide antibiotics in dairy goats can generate residues in milk affecting the safety of related products such as cheeses. For this, a macrolide drug routinely applied in dairy goats (tylosin) was selected, and the realization of an *in vivo* experiment that simulates the treatments done in practice as well as the industrial processing of milk from treated goats to obtain Tronchón ripened cheese was planned.

Residual amounts of antibiotics in milk and cheese were assessed by HPLC analysis. Physico-chemical analysis on cheeses was also included in order to identify potential technological failures related to the use of milk from these types of veterinary treatments.

After drug administration, milked goat's milk presented a residual concentration of tylosin of $198,7 \pm 57,8 \mu\text{g}/\text{kg}$, exceeding the MRL legally established for this substance ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$). In addition, cheeses made from this milk, presented a relatively high concentration of antibiotic residues, throughout the period of maturation (day 1: $178,9 \pm 3,3 \mu\text{g}/\text{kg}$; day 30: $140,9 \pm 11 \mu\text{g}/\text{kg}$; day 60: $86,85 \pm 4,74 \mu\text{g}/\text{kg}$), as well as some alterations of their quality mainly related to the texture and degree of proteolysis reached during ripening. On the contrary, after withdrawal period, tylosin residues in goat's milk ($10 \mu\text{g} / \text{kg}$) were lower than the MRL established, and detectable residues was not generated in cheeses after milk processing.

However, although results herein indicate that the off-label use of tylosin, in the conditions described in this work, generate a relatively low concentration of antibiotic residues in goat's milk, it could pose a risk to the consumer's health under certain circumstances. Therefore, similar studies with other drugs belonging to this antibiotic group would be convenient in order to assess the safety of the veterinary practices related to the off-label use of these substances.

Key words: antibiotics, dairy goats, goat milk, cheese

Alumno: Dña. M^a Carmen Beltrán Martínez

Valencia, diciembre de 2016

Tutor Académico: Prof. D. Cristòfol Peris Ribera

Cotutor: Prof. Dña. M^a Pilar Molina Pons

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1. PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE CRUDA DESTINADA A LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS.....	1
1.1. Uso de antibióticos en ganado caprino lechero	1
1.2. Consecuencias de la presencia de residuos de antibióticos en la leche	2
2. EL QUESO DE LECHE DE CABRA	4
2.1. Producción de leche y queso de cabra	4
2.2. Proceso de elaboración del queso de cabra	5
2.3. Calidad y características del queso de cabra	6
3. INFLUENCIA DE LA CALIDAD DE LA LECHE SOBRE LA ELABORACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL QUESO DE CABRA.....	7
3.1. Calidad físico-química de la leche de cabra	7
3.2. Calidad higiénica de la leche de cabra	9
II. OBJETIVO	10
III. MATERIAL Y MÉTODOS	11
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	11
2. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO.....	12
3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA LECHE DE CABRA	12
4. ELABORACIÓN DE LOS QUESOS	13
5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DEL QUESO	15
5.1. Obtención de las muestras de queso	15
5.2. Análisis de propiedades fisicoquímicas	15
5.3. Análisis de Textura	18
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
1. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE TILOSINA SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE Y EL QUESO DE CABRA	20
1.1. Composición química y calidad higiénica de la leche de cabra	20
1.2 Composición química de los quesos de cabra	21
2. EFECTO DE LA PRESENCIA DE TILOSINA SOBRE EL NIVEL DE PROTEÓLISIS Y LIPÓLISIS DEL QUESO DE CABRA.....	23
2.1. Proteólisis	23
2.2. Lipólisis	23
3. EFECTO DE LA PRESENCIA DE TILOSINA SOBRE EL COLOR DEL QUESO DE CABRA.....	24
4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE TILOSINA SOBRE LA TEXTURA DEL QUESO DE CABRA.....	25
V. CONCLUSIONES.....	27
VI. BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de leche de cabra en España (MAGRAMA, 2013)	4
Figura 2. Esquema general del proceso de fabricación de queso	5
Figura 3. Queso Tronchón	7
Figura 4. Diseño experimental	11
Figura 5. Proceso de elaboración del queso	13
Figura 6. Prensa hidráulica horizontal.	14
Figura 7. Cámara de maduración.	14
Figura 8. Equipo NIRS FoodScan para análisis de composición del queso.....	15
Figura 9. Espectrocolorímetro y muestras de queso.	18
Figura 10. Texturómetro Stable Micro Systems.	19
Figura 11. Evolución de la concentración de tilosina (- $\mu\text{g}/\text{kg}$ y - $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.) en el queso de cabra elaborado tras la administración del antibiótico (FT) a lo largo del periodo de maduración.	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites Máximos de Residuos (LMRs) de antibióticos macrólidos en la leche.	2
Tabla 2. Composición físico-química (%) de distintos quesos de cabra.	6
Tabla 3. Parámetros físico-químicos de leche cabra según diferentes autores.....	8
Tabla 4. Composición de la leche de cabra según diferentes autores.	8
Tabla 5. Parámetros de calidad higiénica de la leche.....	9
Tabla 6. Diluciones de leucina para preparar la recta patrón.....	17
Tabla 7. Características de la leche de cabra procedente de animales tratados con tilosina y efecto del tiempo transcurrido desde la administración del antibiótico.	20
Tabla 8. Efecto de la fabricación (concentración de tilosina) y del tiempo de maduración sobre el pH y la composición del queso de cabra.....	21
Tabla 9. Efecto de la fabricación (concentración de tilosina) y del tiempo de maduración sobre el color del queso de cabra.	24
Tabla 10. Efecto de la fabricación (concentración de tilosina) y el tiempo de maduración sobre los parámetros de textura del queso de cabra.....	25

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE CRUDA DESTINADA A LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS

1.1. Uso de antibióticos en ganado caprino lechero

La utilización de medicamentos veterinarios a base de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas del ganado caprino lechero es una práctica generalizada que puede ocasionar la contaminación de la leche si no se toman medidas de protección adecuadas.

Las sustancias antimicrobianas empleadas en ganadería se pueden administrar de diferentes formas, por vía parenteral (subcutánea, intramuscular, endovenosa, etc.), intramamaria y oral (en forma de aditivos alimenticios o disueltos en el agua), existiendo una serie de factores inherentes a su aplicación (Debackere, 1995) tales como la naturaleza del antibiótico, la dosis administrada, la influencia del excipiente, la vía de administración y el estado sanitario de la ubre, que pueden influir en la duración de los tiempos de excreción y por lo tanto, en su presencia en la leche.

Para promover el uso responsable de los antibióticos y preservar la calidad de la leche y sus derivados, han sido publicadas diversas guías de Buenas Prácticas en la utilización de medicamentos veterinarios (EPRUMA, 2008; FIL, 2013), que pretenden dar soporte a veterinarios y ganaderos para mantener la eficacia de los tratamientos, minimizando las reacciones adversas que puede generar la utilización de estas sustancias.

La mamitis es la principal causa de aplicación de terapia antimicrobiana en ganado caprino lechero (Menziés y Ramanoon, 2001; Contreras et al., 2007) y según un estudio realizado por Berruga et al. (2008) para el Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM), actualmente Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), sobre las posibles causas de residuos de antibióticos en leche de pequeños rumiantes, la mayor parte de los veterinarios (76,9%) de caprino lechero tratan los casos de mamitis clínica utilizando mayoritariamente antibióticos betalactámicos (56,8%) y macrólidos (18,3%). Estas sustancias también son las más utilizadas en los tratamientos de secado recomendados por la mayor parte de facultativos (73%), para prevenir la mamitis en lactaciones posteriores.

Un aspecto importante a destacar, en relación al uso de antibióticos en caprino lechero, es la escasa disponibilidad de medicamentos registrados para su uso en esta especie (Veterindustria 2012) lo que obliga a los veterinarios a realizar un uso fuera de especificaciones o “extra-label” de estas sustancias, aplicando medicamentos registrados para otras especies “bajo la cascada de prescripción”. Aunque este tipo de tratamientos veterinarios está considerado en la legislación europea (Directiva 2001/82/EC y Directiva 2004/28/EC) supone una gran responsabilidad para los veterinarios y aumenta el riesgo de aparición de residuos de antibióticos en la leche ya que, en muchas ocasiones, se desconoce el comportamiento de estas sustancias en caprino lechero a nivel metabólico y farmacocinético. De hecho, algunos estudios realizados en ovino y caprino de leche (Molina et al., 2003; Pengov et al., 2009; Ferrini et al., 2010) ponen de manifiesto que el plazo mínimo de seguridad de 7 días, establecido en la legislación para este tipo de tratamientos, no siempre es suficiente para garantizar la ausencia de residuos en la leche.

La utilización de los antibióticos macrólidos es un claro ejemplo de este tipo de tratamientos en caprino lechero. Los macrólidos presentan acción bacteriostática sobre una amplia gama de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas y micoplasmas, por lo que son ampliamente utilizados en medicina veterinaria para combatir diversas enfermedades infecciosas de los animales de abasto.

Su acción antibacteriana se basa en la unión de los antibióticos a la subunidad 50S ribosomal, inhibiendo la translocación del RNA de transferencia desde el punto aceptor del aminoácido lo que impide la formación del enlace peptídico y por tanto, la síntesis de nuevas proteínas microbianas (Papich y Riviere, 2001). También pueden tener efectos inmunomoduladores sobre la inmunidad mediada por células.

Desde el descubrimiento de la eritromicina a principios de los años 50 a partir de un microorganismo del suelo, *Streptomyces erythreus*, han sido aislados y/o sintetizados numerosos macrólidos como la tilosina, tilmicosina y espiramicina, entre otros, que son habitualmente utilizados para el tratamiento y prevención de mamitis y otras patologías de tipo respiratorio en caprino lechero (Berruga et al., 2008; Clothier et al., 2011).

La administración de los antibióticos macrólidos se realiza en forma de tratamientos “extra-label”, ya que no existen presentaciones comerciales de estas sustancias autorizadas para su uso en pequeños rumiantes productores de leche. Esta práctica veterinaria podría comprometer la calidad higiénica de la leche obtenida por contener residuos del medicamento (Amer et al., 2012) y suponer un riesgo para la salud de los consumidores.

1.2. Consecuencias de la presencia de residuos de antibióticos en la leche

Los efectos positivos que conlleva el empleo de medicamentos veterinarios en ganadería pueden verse contrarrestados por la presencia de residuos de estas sustancias en los productos obtenidos de los animales tratados.

Para controlar la presencia de los residuos veterinarios en los alimentos y proteger a la salud pública se establecen los Límites Máximos de Residuos (LMR). En el Reglamento (CE) 470/2009 se define el LMR como “la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa (expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ o g/kg sobre la base del peso en fresco) que puede permitirse en los alimentos de origen animal”. En la Tabla 1 se presentan los LMRs fijados por la legislación europea (Reglamento 37/2010/CE) para diferentes antibióticos macrólidos en leche de distintas especies.

Tabla 1. Límites Máximos de Residuos (LMRs) de antibióticos macrólidos en la leche.

Sustancia	Especie animal	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Eritromicina	Bovinos, ovinos, caprinos	40
Espiramicina	Bovinos	200
Tilosina	Bovinos, ovinos y caprinos	50

Así pues, la presencia de residuos de antibióticos, también llamados inhibidores, en la leche cruda destinada a la elaboración de productos lácteos para el consumo humano, puede tener repercusiones negativas en diferentes ámbitos como son el productor de leche, la salud pública y la industria láctea.

Productor de leche.

La presencia de residuos en la leche puede llevar a la prohibición por parte de las autoridades sanitarias de la comercialización de la leche, al ser calificada como “no apta para consumo humano” por contener residuos de medicamentos según el Reglamento CE 853/2004 donde se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, e incluso se puede llevar a cabo la sanción y/o cierre de la explotación productora (Directiva 96/23/CEE).

Para establecer los controles de calidad en la leche cruda de oveja y cabra, así como para establecer los mecanismos de gestión de la trazabilidad y cumplir con la legislación comunitaria en cuanto a la trazabilidad de los alimentos (Reglamento CE 178/2002), se publicó el Real Decreto 752/2011 por el que se establecieron los controles obligatorios a realizar por los agentes del sector, entre los que se encontraba la detección de antibióticos.

La posible restricción de la comercialización de la leche por presencia de residuos de antibióticos, así como los gastos de almacenamiento y/o los costes derivados de la destrucción por incumplimiento de los requisitos del plan de control, son responsabilidad integral del ganadero y representan, a su vez, pérdidas económicas importantes.

Salud pública.

La presencia de antibióticos en la leche y sus productos derivados supone un riesgo para la salud pública ya que puede tener grandes consecuencias desde el punto de vista toxicológico, ocasionando alteraciones de la flora intestinal y reacciones alérgicas que pueden llegar a producir anafilaxia en los casos más extremos (Tollefson et al., 2004; Demoly y Romano, 2005; Sanders et al., 2011). Además, la presencia de antibióticos en los productos alimenticios puede ser la responsable del desarrollo de resistencias microbianas a sustancias farmacológicamente activas, contribuyendo a la propagación a lo largo de la cadena alimentaria (Phillips et al., 2004; Trobos et al., 2009). Estas consecuencias son más graves en aquellos sectores de la población más débiles, como son los ancianos y los niños, ambos tradicionalmente consumidores de leche y productos lácteos.

Muchas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten las altas temperaturas, por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a tratamientos térmicos en la industria (Zorraquino et al., 2008; Roca et al., 2010), lo que agrava el problema para la salud pública.

Industria láctea.

Por otro lado, la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche también puede tener efectos de tipo tecnológico ya que puede afectar los procesos bacterianos requeridos en la elaboración de productos lácteos fermentados como el queso y el yogur.

Los residuos de antibióticos pueden inhibir la producción de ácido por las bacterias de arranque y afectar de manera significativa la elaboración de este tipo de productos, dando lugar a procesos de mala calidad, como la dificultad en el cuajado y la maduración (Perreten y Teuber, 1995; Berruga et al., 2007a,b), llegando incluso a inhibir completamente la fermentación en algunos casos (Grunwald y Petz, 2003) y a la interrupción de los tiempos de fabricación de queso.

En el proceso de elaboración de muchas variedades de queso, especialmente curados, es necesario el empleo de fermentos o estárteres constituidos generalmente por bacterias acido-

lácticas (LAB) que son en la mayoría de los casos, sensibles a las sustancias antimicrobianas, pudiendo inhibirse o verse alteradas por su presencia (Cogan, 1972; Mourot y Lousouarn, 1981) afectando de este modo a la posterior maduración y por tanto, al desarrollo de componentes aromáticos.

Los daños tecnológicos que produce la presencia de estos residuos dependen de la naturaleza de los antibióticos, su concentración en la leche y del tipo de producto a fabricar (Mäyra-Mäkinen, 1995). Goursand (1991) señala que la presencia de bajos niveles de antibióticos, en la leche utilizada para elaborar queso, puede ser la causa de defectos en el sabor, color, textura y la tendencia a la fermentación del ácido butírico.

2. EL QUESO DE LECHE DE CABRA

2.1. Producción de leche y queso de cabra

La leche de cabra se destina mayoritariamente a la elaboración de productos derivados, especialmente queso. En España, la producción de queso de cabra es de 37.800 toneladas (MAGRAMA, 2013) y se encuentra muy localizada en las zonas tradicionalmente productoras de leche de cabra como Andalucía, las Islas Canarias y el litoral mediterráneo (Figura 1).

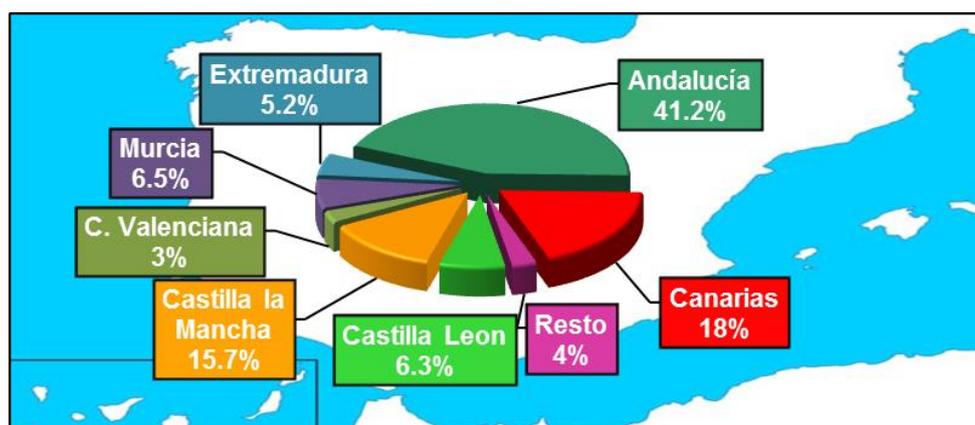


Figura 1. Producción de leche de cabra en España (MAGRAMA, 2013)

El queso de cabra puro representa un pequeño porcentaje del total de la producción nacional, localizándose fundamentalmente en Andalucía, las Islas Canarias, Extremadura y litoral mediterráneo. Esta producción engloba una cantidad de quesos diferentes de los que sólo unos pocos cuentan con el reconocimiento de marcas de calidad. El consumo de este tipo de quesos también se encuentra muy ligado a las zonas de producción por lo que, en muchos casos, la leche de cabra se destina a la elaboración de quesos de mezcla o a la exportación a otros países aunque, en los últimos años, se ha producido un aumento de la popularidad de este tipo de quesos debido a sus características de calidad (Ribeiro y Ribeiro, 2010).

Actualmente, en España existen 26 quesos con Denominación de Origen Protegida (DOP), de los cuales 6 de ellos se elaboran exclusivamente con leche de cabra (Camerano, Murcia, Murcia al Vino,

Los Ibores, Majorero y Palmero) y otros 5 con leche de mezcla, entre la que se encuentra la leche de cabra (Queso de Guía, Gamoneu, Cabrales, Liébana y Picón Bejes-Tresviso).

2.2. Proceso de elaboración del queso de cabra

El Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos, define el queso como “el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche”. En la Figura 2 se presenta un esquema del proceso general de fabricación de queso



Figura 2. Esquema general del proceso de fabricación de queso

Los principales tratamientos previos realizados en la leche corresponden a su filtrado o higienización, estandarización del contenido en grasa de la leche (quesos industriales) y, dependiendo del tipo de queso, la pasteurización o no de la leche (leche cruda).

La fase de coagulación consiste en una serie de modificaciones físico-químicas de las caseínas (proteínas de la leche), que conducen a la formación de un coágulo o gel atrapando los glóbulos grasos. Puede producirse por la acidificación causada por las bacterias lácticas (coagulación láctica) y/o por la actividad del cuajo (coagulación enzimática). La elaboración de la mayor parte de quesos se basa en una coagulación mixta (ácida y enzimática), obteniéndose cuajadas con características intermedias.

Una vez obtenido el gel se procede al corte del mismo, para separar el suero, obteniéndose entonces la parte sólida que constituye la cuajada. Para ello, es preciso recurrir a acciones de tipo mecánico, como son el cortado y el agitado, cuya acción se completa mediante el calentamiento. El desuerado consiste en un proceso de sinéresis o contracción de los granos por eliminación de agua y compuestos solubles, aumentando con ello la firmeza de la cuajada.

Una vez el grano de cuajada alcanza el punto óptimo de desuerado se procede al moldeado y prensado, etapa imprescindible para unir los granos de cuajada. A su vez este proceso permite completar el proceso de desuerado, en el que el queso adquiere la forma, tamaño y características particulares del mismo.

A continuación se procede al salado, que se efectúa en los quesos con el fin de regular el desarrollo microbiano, tanto suprimiendo bacterias indeseables como controlando el crecimiento de los agentes de la maduración. El salado contribuye también a la pérdida de suero y mejora el sabor del queso. Este proceso puede realizarse en seco o por inmersión en un baño de salmuera.

En el caso de quesos curados el proceso de elaboración terminará con la etapa de maduración durante un tiempo determinado bajo condiciones de temperatura y humedad específicas. Durante la maduración también se podrán realizar diferentes operaciones (volteado, cepillado, ahumado, etc.) que contribuyen a las características de cada queso.

2.3. Calidad y características del queso de cabra

La calidad y las características del queso de cabra están directamente relacionadas con la calidad de la leche cruda empleada como materia prima así como con las características del proceso de elaboración.

En la Tabla 2 se presentan los valores de la composición físico-química de distintos tipos de quesos elaborados con leche de cabra, donde se puede observar una gran variabilidad en los principales componentes del mismo.

Tabla 2. Composición físico-química (%) de distintos quesos de cabra.

Tipo de queso	Días maduración	Materia seca	Grasa	Proteína	Sal	Referencias
Majorero	90	61	32	22	2,8	Martin-Hernández <i>et al.</i> (1992)
Mato ¹	-	33	16	12	-	Capellas <i>et al.</i> (2001)
Ibores	60	59	31	23	2,5	Mas <i>et al.</i> (1991)
Servilleta ¹	-	38	18	14	-	Sendra y Saldo (2004)
Carioricotta	7	47	17	17	3,0	Albenzio <i>et al.</i> (2006)

¹Queso fresco

Así, la humedad de los quesos difiere considerablemente entre los distintos tipos de quesos, siendo mayor en los quesos frescos que presentan por tanto un menor porcentaje de extracto seco (ES). El extracto seco (ES) del queso está formado por todos los componentes sólidos incluyendo proteínas, materia grasa, vitaminas, minerales y azúcares. Además de influir en el valor nutritivo, también juega un papel fundamental en otros aspectos de la maduración, ya que determina algunas características importantes como la textura (Fox *et al.*, 2000) y el color (Pinho *et al.*, 2004; Jaramillo, 2008).

Las diferencias en relación al contenido de grasa en los distintos tipos de queso pueden estar relacionadas con la composición de la leche (en particular de la relación proteína/grasa) y con el proceso de elaboración del queso. La grasa, además de ser el principal componente del queso, está muy relacionada con el flavor ya que influye sobre él de forma directa. Los quesos elaborados con leche de cabra contienen un mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena corta y media (caproico, cáprico y caprílico) que le confieren al queso sabores diferentes a los elaborados con la leche de vaca (Duran *et al.*, 2010).

En general, el contenido proteico del queso es elevado y a la vez muy variable según la tecnología aplicada. Las proteínas que predominan en el queso al igual que en la leche, son las caseínas (α_1 , α_2 , β y κ caseínas) que son diferentes según la especie animal. Estas diferencias de la fracción caseínica entre la leche de distintas especies determinan el tiempo de coagulación por acción enzimática y la firmeza del coágulo en la fabricación del queso (Soriano, 2009).

Los fenómenos de proteólisis provocan la hidrólisis de la caseína a péptidos y aminoácidos, transforman muchos de estos compuestos en otros directamente implicados en el flavor del queso (McSweeney y Sousa, 2000; Guinee y McSweeney, 2006) y la textura (Lucey et al., 2003).

Otros componentes presentes en el queso en menor medida son las vitaminas y minerales. El contenido en vitaminas hidrosolubles es variable en función de las pérdidas en el suero, mientras que las vitaminas liposolubles se incrementan debido al elevado contenido graso del queso. A su vez el contenido de minerales del queso es mayor que en la leche, destacan el aumento del calcio, fósforo, sodio y cinc, en detrimento de una baja cantidad de potasio (Park, 2008)

En la Comunidad Valenciana se elaboran diferentes tipos de queso con leche de cabra puro o de mezcla entre los que destacan: Blanquet, Cassoleta, La Nucia, Servilleta y Tronchón. Estos cinco quesos se encuentran reglamentados para su distinción con la Marca de Calidad CV de acuerdo con la Orden 23 de diciembre de 2008, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Uno de los quesos más conocidos es el Tronchón. Este queso, es originario de la localidad aragonesa de Tronchón y se elabora fundamentalmente en la zona del Maestrazgo (Maestrat), que forma parte de tres Comunidades Autónomas (Aragón, Cataluña y la Comunidad Valenciana), más concretamente, en las provincias de Teruel, Tarragona y Castellón. Es un queso cilíndrico elaborado con leche de cabra y/u oveja, con las caras en forma de volcán donde tienen grabado un dibujo en forma de flor (Figura 3). La corteza es semidura, cerrada y su color oscila entre el blanco marfil y el marrón claro (Bueno, 2009).



Figura 3. Queso Tronchón

3. INFLUENCIA DE LA CALIDAD DE LA LECHE SOBRE LA ELABORACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL QUESO DE CABRA

3.1. Calidad físico-química de la leche de cabra

Algunos parámetros físico-químicos presentan especial interés porque permiten valorar la calidad de la leche cruda de cabra. Así, por ejemplo, el pH y la acidez valorable, informan sobre el grado de frescura de la leche y sirven como indicadores de la calidad higiénica mientras que otros, como la densidad y el punto crioscópico, se utilizan para detectar posibles fraudes por adición de

agua. En la Tabla 3 se presentan los parámetros físico-químicos más importantes de la leche de cabra según diferentes autores.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos de leche cabra según diferentes autores.

Densidad (g/l)	Punto crioscópico (-°C)	Acidez (% ácido láctico)	pH	Referencias
1,029-1,039	0,540-0,573	0,14-0,23	6,50-6,80	Park <i>et al.</i> (2007)
1,030	0,554	0,15	6,70	Romero <i>et al.</i> (2013)
1,028-1,030	-	0,17	-	Almeida <i>et al.</i> (2014)
1,029-1,032	0,540-0,550	0,15-0,17	6,4-6,60	Rawya y Ahmed (2014)
1,028-1,039	0,540-0,573	0,14-0,23	6,4-6,80	Rango

Por otra parte, la composición química de la leche reviste una gran importancia ya que determina su calidad nutritiva y muchas de sus propiedades. Así, la aptitud tecnológica de la leche para su transformación en queso depende, en gran medida, de su composición química, especialmente de su contenido en grasa y proteína, ya que presentan una estrecha relación con el rendimiento quesero.

En la Tabla 4 se presenta la composición química de la leche de distintas razas caprinas. En ella se observa una gran variabilidad entre los parámetros de composición debido a que estos pueden verse afectados por diferentes factores entre los que se encuentran la raza, el estado de lactación, el manejo de la alimentación y el estado sanitario, entre otros (Park *et al.*, 2007; Goetsch *et al.*, 2011).

Tabla 4. Composición de la leche de cabra según diferentes autores.

Raza	Materia seca	Proteína	Lactosa	Grasa	Referencias
Boer	-	4,97-5,03	4,48-4,97	6,13-6,39	Mmbengwa <i>et al.</i> (2000)
Nguni	-	4,54-4,95	4,27-4,51	6,04-7,48	Mmbengwa <i>et al.</i> (2000)
Griega	14,80	3,77	4,76	5,63	Raynal-Ljutovac <i>et al.</i> (2005)
Nubian	13,2-14,6	3,90-4,50	-	4,40-4,50	Soryal <i>et al.</i> (2005)
Sarda	-	3,90	-	5,10	Raynal-Ljutovac <i>et al.</i> (2005)
Canaria	13,64	4,82	-	3,87	Salvador <i>et al.</i> (2006)
Damascus	11,30-12,90	3,20-3,90	2,3-4,9	3,60-4,90	Bhosale <i>et al.</i> (2009)
Granadina	13,57	3,48	4,11	5,23	Sanz Ceballos <i>et al.</i> (2009)
India	12,33-13,66	3,21-4,09	4,19-4,88	3,54-4,54	Bhosale <i>et al.</i> (2009)
Alpina	16,17	6,45	5,02	3,60	Almeida <i>et al.</i> (2014)
Murciano-Granadina	14,67	3,72	4,66	5,61	Beltrán <i>et al.</i> (2014)
Saanen	11,61	3,55	4,85	3,15	Ameida <i>et al.</i> (2014)
Rango	11,30-16,17	3,20-6,45	2,30-5,02	3,15-7,48	

3.2. Calidad higiénica de la leche de cabra

La legislación europea relativa a la higiene de los alimentos de origen animal destinados a la alimentación humana (Reglamentos CE nº 852, 853 y 854/2004) realiza una valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en base a su contenido en gérmenes totales, células somáticas y residuos de antibióticos, estableciendo para cada uno de estos parámetros unos valores máximos (Tabla 5), para que la leche pueda ser comercializada en el ámbito de la Unión Europea.

Tabla 5. Parámetros de calidad higiénica de la leche.

Parámetro	Vaca	Oveja y cabra	
Recuento gérmenes totales (ufc/ml) ¹	100.000	500.000 ³	1.500.000 ⁴
Recuento células somáticas (cel/ml) ²	400.000	-	-
Presencia de antibióticos	Ausencia de residuos por encima de los límites de seguridad establecidos en la UE		

¹Media geométrica observada durante un periodo de dos meses con un mínimo de dos determinaciones al mes;

²Media geométrica observada durante un periodo de tres meses con, al menos, una determinación al mes;

³Cuando el proceso de elaboración de los productos derivados no incluye ningún tratamiento térmico; ⁴Cuando el proceso de elaboración de los productos derivados incluye tratamiento térmico. Fuente: Reglamento (CE) 853/2004.

La presencia de antibióticos en la leche es uno de los parámetros higiénicos más importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria debido a la repercusión que puede tener sobre la calidad de la leche destinada a la fabricación de productos derivados como el queso. Los antibióticos, además de interferir en los procesos de fabricación, pueden quedar retenidos en cantidades variables en los productos lácteos terminados (Adetunji, 2011), suponiendo un riesgo para la salud de los consumidores.

Así, Berruga et al. (2007b), observaron que la presencia de antibióticos betalactámicos en la leche de oveja empleada en la fabricación de queso Manchego, a concentraciones equivalentes a sus respectivos LMRs, provocan un retraso en la acidificación de la leche dificultando el proceso de fabricación. En un trabajo más reciente, Calabuig (2015) observó que la presencia de enrofloxacin y ciprofloxacina en leche de cabra al LMR, afectaba significativamente los parámetros de calidad relacionados con la textura y el color de los quesos curados.

Por otra parte, Balerdi (2014), al fabricar queso fresco con leche de cabra adicionada de enrofloxacin y ciprofloxacina a sus respectivos LMRs, observó una retención importante de ambas quinolonas (40 y 45 %, respectivamente) en el queso. En ese sentido hay que destacar que, actualmente, no se han establecido LMRs para los productos derivados de la leche y por tanto, no se puede valorar el riesgo de procesar leche con residuos admisibles de antibiótico.

Los estudios anteriormente citados corresponden a experimentos *in vitro*, en los que el antibiótico es adicionado a la leche, siendo muy limitada la información relativa a la influencia de los antibióticos procedentes de animales tratados con estas sustancias, que pueden ser metabolizadas por el animal y variar su actividad y/o concentración en la leche. Por tanto resulta conveniente realizar experimentos en las situaciones reales de campo que permitan conocer, con mayor profundidad, el impacto de los tratamientos del ganado caprino lechero sobre la calidad de la leche y los productos derivados.

Objetivo

II. OBJETIVO

La presencia de residuos de antibióticos en la leche cruda puede tener graves consecuencias, ya que puede suponer un riesgo para la salud de los consumidores y ser la causa de problemas tecnológicos durante la fabricación de productos derivados como el queso, por lo que resulta totalmente necesario su control.

Por otra parte, la escasa disponibilidad de antibióticos registrados para su uso en caprino lechero hace que, en bastantes ocasiones, se realicen tratamientos fuera de especificaciones o “extra-label”, lo que incrementa el riesgo de aparición de residuos en la leche, al desconocer los tiempos de supresión requeridos para garantizar la inocuidad de la leche. Este es el caso de los antibióticos macrólidos que son utilizados por los veterinarios de campo en el tratamiento de diversas patologías del caprino lechero, empleando presentaciones comerciales registradas para otras especies ganaderas, como el bovino, para lo que deben extrapolar la información registrada para el ganado vacuno al caso del caprino lechero, no existiendo información sobre la repercusión que este tipo de aplicaciones puede tener sobre la calidad y seguridad de la leche.

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la verificación del impacto de la aplicación de tilosina, uno de los macrólidos de mayor uso en cabras lecheras, según las condiciones de campo descritas por facultativos del sector, sobre la seguridad de la leche y los quesos obtenidos.

Material y Métodos

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 4 se presenta el diseño experimental utilizado para cubrir los objetivos planteados en este trabajo.

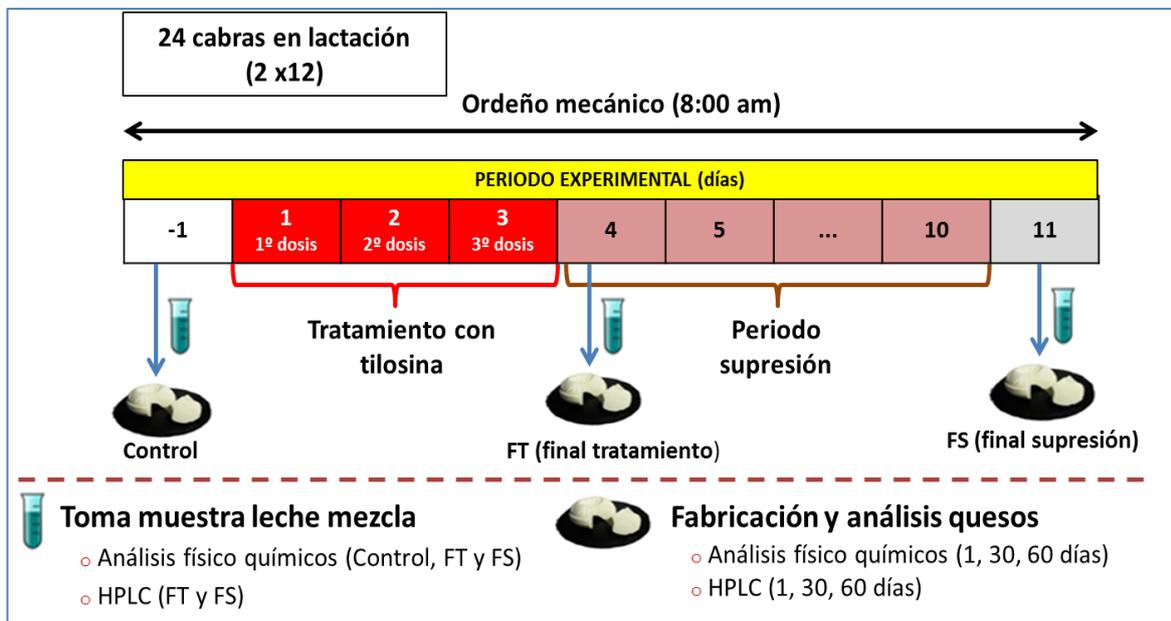


Figura 4. Diseño experimental

En este trabajo se ensayó un tratamiento con uno de los antibióticos macrólidos, la tilosina, utilizado habitualmente por los veterinarios en ganado caprino lechero, que no se encuentra registrado para esta especie ganadera por lo que su uso en cabras se considera fuera de especificaciones o “extra-label”. Para comprobar la presencia de residuos de antibióticos en la leche y el queso de cabra después de la aplicación “extra-label” de esta sustancia, se realizó un experimento *in vivo* que simula las condiciones de utilización a nivel de campo.

El experimento se llevó a cabo por duplicado, utilizando dos lotes de cabras sanas de 12 animales cada uno de ellos. La administración del antibiótico se realizó según las indicaciones de algunos veterinarios que lo emplean en la práctica, estableciéndose un periodo de supresión de 7 días, tal como exige la legislación europea para este tipo de tratamientos.

Un día antes de empezar el tratamiento con tilosina, los animales de cada uno de los lotes se ordeñaron y con la leche de mezcla obtenida se realizó una elaboración de queso curado que serviría como referencia o control (FC). También se tomó una muestra de leche mezcla del grupo para su caracterización. Al día siguiente de finalizar el tratamiento y tras el cumplimiento del periodo de supresión establecido, se realizaron otra toma de muestras de leche del grupo y las fabricaciones de queso correspondientes (FT y FS, respectivamente).

Se determinó la composición química y la calidad higiénica de la leche de cabra empleada en las distintas fabricaciones de queso. También se analizaron los quesos a distintos tiempos de maduración (1, 30 y 60 días) con objeto de detectar defectos de fabricación asociados al tratamiento

veterinario y la presencia de residuos de tilosina que pudieran comprometer la salud de los consumidores.

2. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

Se ha utilizado una presentación comercial de tilosina que como se ha comentado anteriormente, no está registrada para ganado caprino lechero siendo su registro de uso para el ganado bovino y porcino, especies para las que se han establecido las dosis, vías de aplicación y periodo de supresión recomendados. La tilosina se administró siguiendo las indicaciones de varios profesionales del sector que utilizan habitualmente este antibiótico bajo la “cascada de prescripción”, en el tratamiento de mamitis y otras patologías infecciosas del caprino lechero.

El medicamento utilizado fue TRELACÓN (Tilosina 200 mg/ml) de los Laboratorios Elanco Valquímica, S.A. (Madrid, España), empleando una dosis de 0,5 ml/10 kg p.v. que se administró, vía intramuscular, durante 3 días consecutivos inmediatamente después del ordeño.

El tiempo de supresión considerado en este trabajo fue de 7 días tras la aplicación de la última dosis de antibiótico, tal como estipula la reglamentación europea para este tipo de tratamientos veterinarios (Directiva 2004/28/CE).

3. OBTENCIÓN Y ANALISIS DE LA LECHE DE CABRA

Los animales empleados en este trabajo fueron cabras de raza Murciano-Granadina pertenecientes al rebaño experimental del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de Valencia (UPV).

Se utilizaron dos lotes de animales experimentales y cada lote estaba formado por un total de 12 cabras que se encontraban en el cuarto mes de lactación, presentaban un buen estado sanitario y no habían recibido ningún tratamiento veterinario que pudiera interferir con los resultados.

Las cabras fueron alimentadas con una ración a base de concentrados (cebada, maíz y soja), pulpa de naranja y alfalfa, cumpliendo con las necesidades de lactación.

Tras el parto, los animales se ordeñaron una vez al día (8 a.m.) en una sala de ordeño mecánico tipo CASSE, 2x12x6 en línea alta.

Se tomaron muestras de la leche de cabra empleada en cada una de las elaboraciones de queso que se analizaron en el Laboratorio de Análisis de leche de la UPV, donde se analizó la composición química mediante un equipo basado en la espectrofotometría del infrarrojo (MilkoScan FT 6000, Foss, Hillerød, Dinamarca) previamente calibrado para la leche de cabra. También se determinó el recuento de células somáticas según el método fluoro-opto electrónico, con la utilización del equipo automático Fossomatic 5000 (Foss) y el recuentos de gérmenes totales con el equipo BactoScan FC (Foss).

Para cuantificar el antibiótico residual presente en la leche de las cabras tratadas, se analizaron las muestras por HPLC-MS/MS en el Instituto Lactológico de Lekunberri (Pamplona), según procedimiento validado por el propio laboratorio para la detección de antibióticos macrólidos en muestras de leche, según la Decisión 657/2002/CE.

4. ELABORACIÓN DE LOS QUESOS

Los quesos se fabricaron en la Planta Piloto del Departamento de Ciencia Animal (UPV) siguiendo el proceso de elaboración que se presenta en la Figura 5 y que corresponde al del queso Tronchón tradicional de la Comunitat Valenciana.

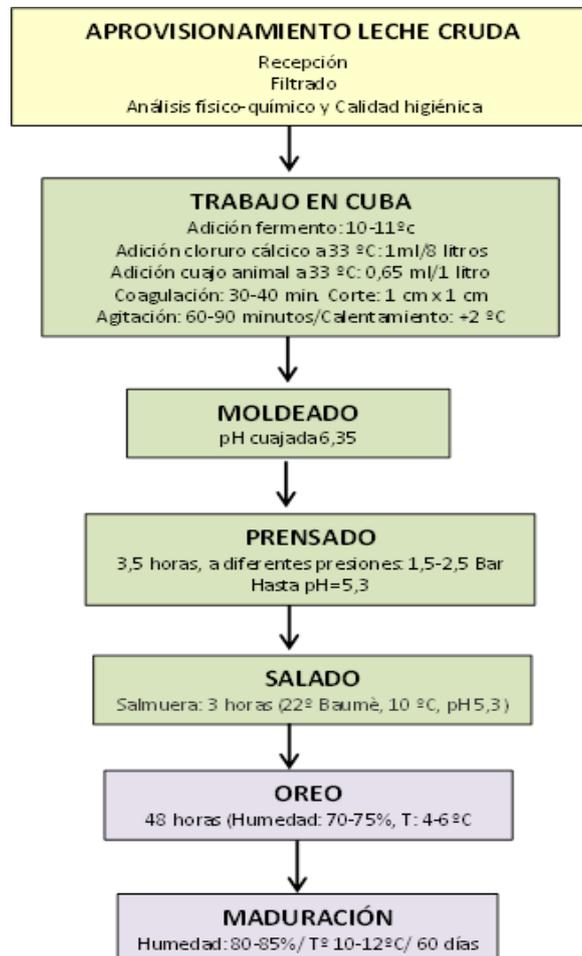


Figura 5. Proceso de elaboración del queso

El proceso de elaboración se inició inmediatamente después del ordeño para preservar la integridad de los antibióticos que pudieran estar presentes en la leche y poder evaluar su efecto sobre el proceso y las características de los quesos.

Tras colocar la leche de cabra (25 litros) en la cuba de cuajado, se adicionó un fermento láctico, predominantemente mesófilo, siguiendo las indicaciones del fabricante (Choozit MA 4001. Cheese Cultures, Danisco, Francia). Seguidamente se calentó la leche hasta alcanzar una temperatura de $33 \pm 1^\circ\text{C}$, momento en el que se adicionó cloruro cálcico (Proquical, Proquiga, España) a razón de 1 ml/8 L de leche y cuajo (Quimosina > 70%. Suministros Químicos Arroyo, Santander, España) en una proporción de 0,65 ml/L de leche. Tras homogeneizar por agitación durante un minuto, se dejó la leche en reposo durante 30-40 minutos para permitir la formación de la cuajada.

Una vez obtenida la cuajada, se cortó con una lira para obtener los granos de cuajada que se mantuvieron en agitación suave durante al menos 1 hora, hasta obtener el grado de humedad requerido para la elaboración de este tipo de queso y un pH comprendido entre 6,35 y 6,40. Seguidamente se procedió al desuerado y posterior moldeado de la cuajada, obteniendo 5 piezas de queso Tronchón de unos 800 g.

Inmediatamente después del moldeado los quesos se introdujeron en la prensa (Figura 6), donde permanecieron durante 3 horas y 15 minutos bajo presión creciente. Así pues, el prensado se dividió en tres fases. En la primera, los quesos estuvieron 1,5 horas a una presión de 1,5 bares. Seguidamente se voltearon los quesos dentro del molde y se colocaron nuevamente en la prensa durante 1,5 horas a 2 bares. Finalmente, se retiró el paño del molde y se prensaron durante 15 minutos más a 2,5 bares de presión.



Figura 6. Prensa hidráulica horizontal.

Tras el prensado se determinó el pH de los quesos para comprobar si se habían acidificado convenientemente por acción de los fermentos adicionados, alcanzando un pH de alrededor de 5,3. En caso contrario, se mantenían a temperatura ambiente hasta completar el proceso de acidificación. Una vez alcanzado dicho pH se inició el proceso de salado de los quesos por inmersión en salmuera acidificada (22º Baumè a 10 °C, pH= 5,3) durante 3 horas. Después del salado, los quesos se colocaron de nuevo en el molde y se mantuvieron durante 48 horas en la cámara de oreo (6-7 °C, 70-75% HR). Transcurrido este tiempo, se sacaron del molde y se colocaron en la cámara de maduración (10-12°C, 80-85% HR) donde permanecieron un total de 60 días (Figura 7). Durante este periodo los quesos fueron volteados periódicamente.



Figura 7. Cámara de maduración.

5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DEL QUESO

5.1. Obtención de las muestras de queso

De cada una de las fabricaciones de queso se tomaron muestras (1 pieza) en distintos momentos del periodo de maduración (1, 30 y 60 días).

Los quesos se mantuvieron convenientemente conservados para la realización de las correspondientes determinaciones analíticas.

5.2. Análisis de propiedades fisicoquímicas

5.2.1. pH

Durante el proceso de fabricación del queso y en los diferentes momentos de la maduración, la medida del pH se realizó con un pH-metro portátil (Crison, Barcelona, España) dotado de un electrodo de punción.

5.2.2. Composición química del queso

La composición química del queso (grasa, proteína, extracto seco y contenido en sal) se determinó con un equipo de infrarrojo cercano NIRS FoodScan (Foss, Hillerød, Dinamarca) calibrado para las muestras de queso (Figura 8). Previamente al análisis, se acondicionaron las muestras triturando una porción de queso sin corteza en una picadora de uso doméstico (Moulinex, España). A continuación se colocó parte del triturado en una placa Petri, extendiendo el contenido con ayuda de una espátula para que quedara repartido de forma homogénea, sin huecos, obteniendo una superficie totalmente lisa.

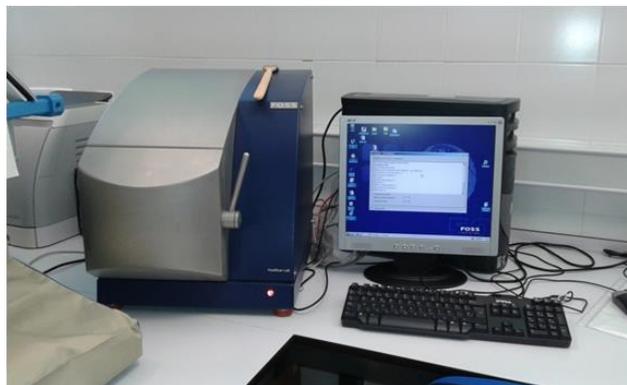


Figura 8. Equipo NIRS FoodScan para análisis de composición del queso.

5.2.3. Cuantificación de tilosina residual

Las muestras de queso de las distintas fabricaciones fueron enviadas al Instituto Lactológico de Lekunberri (Pamplona) donde fueron analizadas mediante un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Premier con bomba Acquity de UPLC de Waters) validado para la detección de macrólidos en muestras de queso, según la Decisión 657/2002/EC.

5.2.4. Proteólisis.

Para el análisis del índice de proteólisis en el queso se siguió el método de la ninhidrina descrito por Folkertsma y Fox (1992). El análisis se realizó sobre muestras de queso que habían permanecido congeladas (-80 °C) para todos los tiempos de maduración, que se descongelaron previamente el día anterior dejándolas en refrigeración hasta el mismo momento del análisis.

La determinación de la proteólisis por este método consta de dos fases, en la primera fase se obtiene la fracción nitrogenada soluble (FSA) del queso y en la segunda, se cuantifican los aminoácidos libres a partir de una reacción colorimétrica que tiene lugar entre el reactivo (cadmio-ninhidrina) y los grupos α -amino que se encuentran en la FSA, para formar un cromóforo violáceo sobre el que se mide la absorbancia a 507 nm.

Para obtener la fracción nitrogenada soluble en agua (FSA) se pesaron 30 g de la muestra de queso en un matraz Erlenmeyer previamente tarado, al que se adicionaron 70 ml de agua destilada. La mezcla se homogenizó durante 5 minutos a 5000 rpm con el equipo Ultraturrax T25 (Jankel & Kunkel, Alemania) y posteriormente se mantuvo en un baño de agua a 40 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo, se pasó el contenido del matraz a tubos de centrifuga para su posterior centrifugado a 7000 rpm durante 30 minutos, a una temperatura de 10 °C. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de los tubos sobre un matraz Erlenmeyer con ayuda de lana de vidrio.

Seguidamente se procedió a la cuantificación de los aminoácidos libres totales en la FSA. Para ello se preparó el reactivo cadmio-ninhidrina y soluciones de leucina a distinta concentración para establecer la recta patrón, del modo que se especifica a continuación.

Reactivo cadmio-ninhidrina

En un vaso de precipitados de 250 ml se añadieron 0,8 g de ninhidrina (178 g/mol, Sigma-Aldrich, Madrid, España), 80 ml de etanol absoluto y 10 ml de ácido acético glacial. El contenido del vaso se agitó hasta su completa disolución con un agitador magnético. En otro vaso de precipitados de 100 ml se añadió 1 g de cloruro de cadmio (99 %, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 1 ml de agua destilada (a partir de aquí se trabajó en la campana de extracción de gases) y se agitó la mezcla con una varilla de vidrio hasta la completa disolución del cloruro de cadmio. Seguidamente, esta disolución se añadió a la disolución de ninhidrina y se almacenó en refrigeración a 4 °C tapado con parafilm.

Disoluciones de leucina

En la Tabla 6 se presentan las disoluciones de leucina empleadas en este trabajo. Para obtener la disolución "A", se pesaron 30 mg de leucina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en un matraz Erlenmeyer al que se añadieron 100 ml de agua destilada. Para la disolución "B", se utilizaron 20 mg de leucina en 100 ml de agua destilada y para la disolución "C" se emplearon 10 ml de la disolución "B" a los que se adicionaron 100 ml de agua destilada. Para su correcta conservación, los matraces se envolvieron con papel aluminio, ya que la leucina es fotosensible, y se almacenaron a 4 °C.

A partir de estas disoluciones iniciales de leucina, se prepararon las diluciones necesarias para poder calcular la recta patrón y, a partir de ella, el contenido en leucina de las muestras experimentales, expresando los resultados en mg de leucina /gr de queso

Tabla 6. Diluciones de leucina para preparar la recta patrón.

Disolución	Volumen (μL)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100
“A”	Leucina (mg)	0,3	0,27	0,24	0,21	0,18	0,15	0,12	0,09	0,06	0,03
Disolución	Volumen (μL)	800	700	600	500	400	300	200	100		
“B”	Leucina (mg)	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02		
Disolución	Volumen (μL)	800	300	100							
“C”	Leucina (mg)	0,016	0,004	0,002							

Para ello se colocó en un tubo de ensayo, el volumen de la disolución que contenía la cantidad de leucina deseada (Tabla 6) completando con agua destilada hasta un total de 1000 μL en caso necesario. Seguidamente se añadieron 2 ml del reactivo cadmio-ninhidrina y se calentó la mezcla en un baño de agua a 84 °C durante 5 minutos. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de la absorbancia a 507 nm con el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España).

Para la realización del análisis de los quesos experimentales se tomó un volumen de la FSA previamente obtenida, comprendido entre 80 y 95 μL dependiendo del momento de maduración de la muestra (1 día: 95 μL, 30 días: 90 μL y 60 días: 80 μL), que se colocaron en tubos de ensayo completando hasta 1000 μL con agua destilada. Seguidamente se añadieron 2 ml de reactivo de cadmio-nihidrina y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para las muestras de leucina de la recta patrón.

5.2.5. Lipólisis

El análisis del índice de lipólisis se realizó siguiendo la metodología descrita por Nuñez et al. (1986) sobre las muestras de queso a diferentes tiempos de maduración (1, 30 y 60 días) con objeto de estudiar la variación del contenido en ácidos grasos libres.

Para ello se homogeneizaron 10 g de queso con 6 g de Na₂SO₄ anhidro en un vaso de precipitados de 250 ml y posteriormente se añadieron 60 ml de éter de petróleo 40-65 °C, manteniendo la mezcla en agitación durante dos horas para realizar la extracción de la grasa. A continuación, se filtró la muestra durante aproximadamente 5 minutos recogiendo el filtrado en un matraz de fondo redondeado previamente tarado. Posteriormente se colocó el matraz en un rota-vapor (RV 10 D S99, IKA, Alemania), donde se destiló el éter a 40 °C durante 15 minutos. Seguidamente se dejó el matraz con el extracto lipídico durante 30 minutos en una campana de extracción de gases para asegurar su completa evaporación. Trascorrido ese tiempo se volvió a pesar el matraz y, por diferencia de pesada, se obtuvieron los gramos de grasa extraídos de la muestra de queso.

Para el cálculo del índice de lipólisis se procedió a la valoración de la acidez del extracto lipídico obtenido, valorando con una disolución de KOH etanólico 0,1M en presencia de fenolftaleína como indicador. Los análisis se realizaron por duplicado y la concentración de Ácidos Grasos Libres (AGL) en las muestras de queso se expresa en meq/100 gr de grasa mediante la siguiente expresión:

$$\text{meq/100 gr de grasa} = \frac{\text{KOH(mL)} \times 0,1}{\text{grasa total(g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

5.2.6. Color

La caracterización objetiva del color del queso se ha realizado considerando las coordenadas colorimétricas del espacio L^* , a^* y b^* , siendo L^* la luminosidad, a^* la desviación hacia el rojo (+) y el verde (-), y b^* la desviación hacia el amarillo (+) y el azul (-). Para ello se utilizó un espectrocolorímetro (CM 3600D, Minolta, Japón) tomando como referencia el observador 10° e iluminante D65 (Figura 9). Las lecturas se realizaron a temperatura ambiente sobre las muestras de queso previamente preparadas. A partir de las coordenadas a^* y b^* se han calculado las magnitudes psicofísicas croma o pureza de color (C^*) y tono (h) mediante las ecuaciones 2 y 3, respectivamente.

$$C = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$h = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad \text{Ecuación (3)}$$

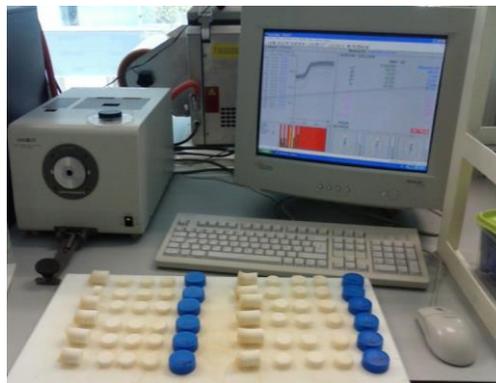


Figura 9. Espectrocolorímetro y muestras de queso.

Para el análisis de color se efectuaron 9 mediciones en cada uno de los quesos, seleccionando una muestra para cada una de las fabricaciones y tiempo de maduración. Las muestras se cortaron en cilindros de 2 cm de diámetro y 1 cm de grosor.

5.3. Análisis de Textura

Para la determinación de la textura se realizó una prueba empírica denominada Análisis de Perfil de Textura (TPA), que consiste en una determinación de doble compresión en las que se someten las muestras de queso a una compresión del 80-90% de su altura inicial y que fue desarrollada para imitar la acción de compresión de los dientes durante la masticación (Bourne 2002).

Los parámetros analizados fueron los correspondientes al perfil de textura: dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, y masticabilidad (Guamis et al 1996, Delgado et al 2012), que se midieron a partir de la curva de deformación obtenida.

La prueba se realizó con un texturómetro (Figura 10) TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Para el análisis de textura se realizaron 9 mediciones en cada uno de los quesos, seleccionando un queso para cada una de las fabricaciones y tiempo de maduración considerado. Las

muestras se cortaron en cilindros de 2 cm de diámetro y 1 cm de grosor. La textura fue medida a una temperatura constante de 20 ± 1 °C.



Figura 10. Texturómetro Stable Micro Systems.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVI.II. Mediante este programa se realizó el análisis descriptivo de los datos obtenidos en las diferentes mediciones analíticas. También se aplicó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) para estudiar el efecto de los factores de variación considerados. En el caso de las características de la leche se utilizó un modelo estadístico que incluía los efectos del Lote experimental y la Fabricación:

$$Y_{ij} = \mu + L_i + F_j + \varepsilon_{ij}$$

siendo: Y_{ij} = Variable dependiente; μ = Media general; L_i = Lote experimental (1 y 2); F_j : Fabricación (FC: fabricación control, sin antibiótico; FT: fabricación tras finalizar la administración de tilosina; FS: fabricación después del periodo de supresión); ε_{ij} = Error residual

En el caso de las características del queso se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + TM_j + (F_i \times TM_j) + \varepsilon_{ijk}$$

siendo: Y_{ijk} = Variable dependiente; μ = Media general; F_i = Fabricación (FC: fabricación control, sin antibiótico; FT: fabricación tras finalizar la administración de tilosina; FS: fabricación después del periodo de supresión); TM_j = Tiempo de Maduración (1, 30 y 60 días); $F_i \times TM_j$ = Interacción; ε_{ijk} = Error residual

Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE TILOSINA SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE Y EL QUESO DE CABRA

1.1. Composición química y calidad higiénica de la leche de cabra

La composición química y la calidad higiénica de la leche de cabra procedente de los animales tratados con tilosina se presentan en la Tabla 7. En general, se observa que los valores obtenidos en este trabajo son similares a los indicados por otros autores para la leche de esta especie (Soryal et al., 2005; Beltrán et al., 2014).

Al comparar la calidad media de la leche de cabra en función del lote de animales empleado y de los días transcurridos desde la administración del antibiótico, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los parámetros considerados. Así, la leche ordeñada fue similar en ambos grupos experimentales y la aplicación del medicamento no tuvo ninguna influencia sobre la calidad de la leche ordeñada a lo largo de todo el periodo experimental.

Tabla 7. Características de la leche de cabra procedente de animales tratados con tilosina y efecto del tiempo transcurrido desde la administración del antibiótico.

Parámetro	Lote		ANOVA			Fabricación				ANOVA	
	1	2	ES	F-Ratio	P	Control	FT	FS	ES	F-Ratio	P
pH	6,76	6,74	0,01	4,74	ns	6,77	6,72	6,78	0,01	4,87	ns
ES (%)	14,00	14,51	0,21	1,45	ns	13,86	14,29	14,59	0,26	1,38	ns
Grasa (%)	5,02	5,32	0,18	6,72	ns	4,91	5,20	5,42	0,22	3,26	ns
Proteína (%)	3,58	3,75	0,05	1,10	ns	3,66	3,57	3,77	0,06	3,07	ns
Lactosa (%)	4,72	4,68	0,02	7,52	ns	4,68	4,76	4,67	0,02	2,75	ns
Log RCS	5,52	5,67	0,09	1,31	ns	5,68	5,48	5,63	0,11	0,81	ns
Log BAC	4,30	4,22	0,12	1,23	ns	4,24	4,39	4,14	0,15	0,96	ns

FT: Final tratamiento; FS: Final periodo de supresión, ES: Extracto seco; Log RCS: logaritmo del recuento de células somáticas; Log RGT: logaritmo del recuento de gérmenes totales; ns no significativo.

Los análisis cromatográficos realizados en la leche procedente de las cabras tratadas con tilosina indican que la concentración residual de antibiótico 24 horas después de finalizado el tratamiento (FT) es de $198,7 \pm 57,8 \mu\text{g}/\text{kg}$, valor superior al LMR establecido en la legislación para esta sustancia en la leche (LMR= $50 \mu\text{g}/\text{kg}$). Tras el periodo de supresión considerado (7 días), la concentración de tilosina se reduce considerablemente siendo inferior a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Límite de cuantificación del equipo) en la leche procedente del primer lote de cabras en experimentación, y no detectable en la del segundo.

Así pues, parece ser que la administración “extra-label” de esta sustancia en las condiciones utilizadas en este trabajo, que reproducen las de su aplicación práctica en las explotaciones ganaderas, podría ser legalmente aceptado ya que las cantidades residuales tras el periodo mínimo de seguridad de 7 días ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$), no superan el LMR fijado para esta sustancia en la leche ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$). Estos resultados abren la posibilidad de poder iniciar estudios en los que se plantee acortar el

periodo de seguridad establecido por la legislación, lo que puede suponer un beneficio económico para el ganadero sin plantear ningún riesgo para la seguridad alimentaria.

Sin embargo, la presencia de tilosina en la leche, aunque sea en pequeñas concentraciones, podría tener un efecto negativo sobre la seguridad de los quesos ya que parte del antibiótico podría quedar retenido en el queso, llegando incluso a incrementar su concentración como consecuencia de la pérdida de humedad que se produce durante la fase de maduración, suponiendo un riesgo para la salud de los consumidores. De ahí el interés del estudio del efecto de este tratamiento, sobre la seguridad de los quesos curados de cabra.

1.2 Composición química de los quesos de cabra

En la Tabla 8 se presentan los resultados del análisis estadístico del efecto de la fabricación (antibiótico residual) y del tiempo de maduración, sobre las características físico-químicas de los quesos curados de leche de cabra.

Los quesos elaborados con la leche ordeñada tras finalizar el tratamiento con tilosina (FT) presentan un mayor porcentaje ($P < 0,05$) de materia grasa y de extracto seco que los quesos de las otras fabricaciones (FC y FS), así como un menor ($P < 0,05$) contenido en sal. También presentan un valor de pH significativamente más alto ($P < 0,05$) que los del grupo control (FC) lo que podría estar relacionado con la elevada presencia de antibiótico en la leche de cabra utilizada para su elaboración ($198,7 \pm 57,8 \mu\text{g}/\text{kg}$), que reduce la conversión de lactosa en ácido láctico por parte de las bacterias ácido lácticas presentes en el queso.

Tabla 8. Efecto de la fabricación (concentración de tilosina) y del tiempo de maduración sobre el pH y la composición del queso de cabra.

Parámetro	Fabricación				ANOVA		Tiempo de maduración (días)				ANOVA	
	Control	FT	FS	ES	F-Ratio	P	1	30	60	ES	F-Ratio	P
pH	5,26 ^a	5,31 ^b	5,32 ^b	0,02	5,25	*	5,43 ^b	5,22 ^a	5,24 ^a	0,01	60,87	***
EST (%)	58,89 ^a	61,00 ^c	59,83 ^b	0,09	132,9	***	55,47 ^a	60,59 ^b	63,66 ^c	0,09	2033	***
Grasa (%)	31,21 ^a	33,75 ^c	32,86 ^b	0,07	340	***	30,15 ^a	32,94 ^b	34,72 ^c	0,07	1086,1	***
Proteína (%)	22,63 ^b	22,57 ^b	22,12 ^a	0,06	21	***	20,44 ^a	22,72 ^b	24,16 ^c	0,06	948,9	***
Sal (%)	2,22 ^c	2,08 ^a	2,12 ^b	0,01	34,07	***	1,80 ^a	2,21 ^b	2,41 ^c	0,01	656,2	***

FT: Final tratamiento; FS: Final periodo de supresión, EST: extracto seco total; ^{a, b, c}: letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Por otra parte, los quesos elaborados con la leche ordeñada tras la finalización del periodo de supresión (FS), difieren significativamente de los quesos de los otros dos grupos (FC y FT) en la mayor parte de parámetros considerados ($P < 0,05$), presentando unas características intermedias a excepción del valor de pH que fue similar ($P > 0,05$) al de los quesos del grupo FT. La presencia de bajas concentraciones de tilosina en la leche tras el periodo de supresión ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) podría estar relacionada con la obtención de estos resultados. La interacción del tratamiento con el tiempo de maduración no fue significativa ($P > 0,05$) en ninguna de las variables estudiadas.

En cuanto al efecto del tiempo de maduración sobre las características de los quesos, en la Tabla 8 se puede observar que todos los componentes aumentan significativamente con el tiempo ($P < 0,001$), debido a la progresiva pérdida de humedad que se produce durante este periodo. A su vez, el pH de los quesos evoluciona en sentido inverso, observándose una reducción del mismo durante los primeros 30 días, para estabilizarse posteriormente ($P > 0,05$) hasta el final del periodo de maduración.

La composición química obtenida en este trabajo es muy similar a la señalada por Rivera et al. (2016) en queso Tronchón de leche cabra. Sin embargo, si se compara con la de otros quesos de cabra de elaboración tradicional como el queso Majorero (Martín-Hernández et al., 1992), Murcia al Vino (Ferrandini et al., 2011) y Babia-Laciana (Franco et al., 2003), se encuentran diferencias más marcadas que podrían estar relacionadas con las características de la leche empleada, así como con el diferente proceso de fabricación de cada uno de estos tipos de queso. El descenso del valor de pH con el tiempo de curación también ha sido señalado por diferentes autores (Saldo et al., 2002; Delgado et al., 2011) en distintos tipos de queso de leche de cabra.

Por otra parte, los análisis cromatográficos realizados sobre las muestras de queso curado indican que los quesos fabricados con la leche ordeñada tras la aplicación de la última dosis de antibiótico (FT) contienen cantidades importantes de tilosina durante todo el proceso de maduración, que se reducen a medida que avanza este periodo (día 1: $178,9 \pm 3,3$ $\mu\text{g}/\text{kg}$; Día 30: $140,9 \pm 11$ $\mu\text{g}/\text{kg}$; día 60: $86,85$ $\mu\text{g}/\text{kg}$). En la Figura 11 se presenta la evolución descendente de la concentración de tilosina en el queso a lo largo del periodo de maduración.

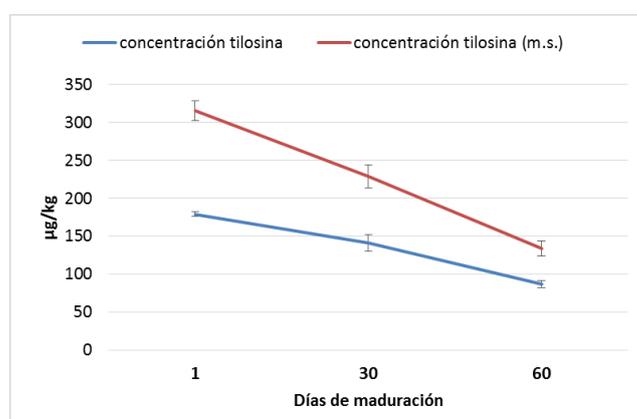


Figura 11. Evolución de la concentración de tilosina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ y $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.) en el queso de cabra elaborado tras la administración del antibiótico (FT) a lo largo del periodo de maduración.

Los resultados de este trabajo indican que el 48,5% de la tilosina transferida desde la leche de cabra queda retenida en el queso curado, mientras que el 51,5% restante, es degradado durante el proceso de maduración. La baja estabilidad de los antibióticos macrólidos en medio ácido (Papich y Riviere, 2001), podría estar relacionada con la reducción de la concentración residual de tilosina en el queso con el tiempo de curado.

A partir de la concentración de tilosina en el queso de 60 días de maduración ($86,85$ $\mu\text{g}/\text{kg}$) y considerando un rendimiento medio en este tipo de elaboraciones de 7,5-8 kg de leche de cabra/kg

de queso curado, podemos estimar que la retención de antibiótico en el queso curado representa el 5,64 % de la concentración inicialmente contenida en la leche.

En los quesos elaborados con la leche del final del periodo de supresión (FS), con un contenido de tilosina $\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$, no se detectaron residuos del antibiótico en ninguno de los tiempos considerados.

2. EFECTO DE LA PRESENCIA DE TILOSINA SOBRE EL NIVEL DE PROTEÓLISIS Y LIPÓLISIS DEL QUESO DE CABRA

2.1. Proteólisis

El nivel de proteólisis se ve reflejado en el contenido de aminoácidos libres (AAL) presentes en el queso, expresados como mg de leucina/g de queso.

El contenido total de AAL en los quesos FT ($1,845 \pm 0,04$ mg de leucina/g), elaborados a partir de leche con un contenido de tilosina superior al LMR, fue considerablemente menor ($P < 0,001$) al de los quesos FC y FS ($2,189 \pm 0,04$ y $2,281 \pm 0,04$ mg leucina/g, respectivamente), que presentaron similares niveles de proteólisis. Este resultado podría estar relacionado con la presencia de antibiótico en el queso, que actuaría inhibiendo el metabolismo de la flora láctica implicada en la degradación de las proteínas afectando, por tanto, al nivel de proteólisis alcanzado en el queso.

El tiempo de maduración también tuvo un efecto significativo ($p < 0,001$) sobre la cantidad de AAL en el queso, que aumentó de manera progresiva hasta el final de este periodo. Así, al inicio de la maduración (día 1) el grado de proteólisis era muy reducido ($0,633$ mg de leucina/g), presentando contenidos mucho mayores a los 30 días ($2,170$ mg de leucina/g) y a los 60 días de maduración ($3,513$ mg de leucina/g).

La interacción entre la fabricación y el tiempo de maduración fue significativa ($P < 0,01$), dado que el menor contenido en AAL en los quesos con antibiótico (FT), respecto a los quesos FC y FS, solo se observó a los 30 y 60 días de maduración, presentando valores similares al inicio de dicho periodo.

La evolución ascendente en el contenido de AAL en queso curado de cabra a lo largo del periodo de maduración, también ha sido señalada por otros autores, como Saldo et al. (2002), quienes observaron niveles de AAL comprendidos entre $0,38$ y $1,36$ mg de leucina/gr en quesos de 4 y 28 días de maduración, respectivamente.

2.2. Lipólisis

El nivel de lipólisis queda reflejado a través de la concentración de ácidos grasos libres (AGL), presentes en el queso, expresados como meq/100 g de grasa de queso.

La fabricación tuvo un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la concentración de AGL presentes en el queso, siendo los quesos elaborados con la leche de cabra tras el periodo de supresión (FS) los que presentaron un mayor nivel de lipólisis ($2,851 \pm 0,06$ meq/100g), mientras que los quesos de las otras dos fabricaciones (FC y FT) presentaron concentraciones similares de AGL ($2,166 \pm 0,06$ y $2,083 \pm 0,06$ meq/100 g, respectivamente). Estos resultados sugieren que existen otros factores, distintos a la presencia de tilosina en la leche de cabra, que influyen sobre el nivel de lipólisis alcanzado en los quesos durante la maduración.

Al igual que para la proteólisis, el tiempo de maduración tuvo un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la concentración de AGL en el queso, que aumentó progresivamente a lo largo de este periodo, obteniendo valores a 1, 30 y 60 días de curación de $1,938 \pm 0,06$ meq/100 g, $2,413 \pm 0,06$ meq/100 g y $2,748 \pm 0,06$ meq/100 g, respectivamente.

La interacción fabricación por tiempo de maduración también resultó significativa ($P < 0,01$) debido, principalmente, a que en los quesos con residuos de tilosina (FT) apenas se incrementó el nivel de lipólisis durante la maduración, hecho que sí se produjo en los quesos de las otras fabricaciones (FC y FS). Este resultado podría estar relacionado con la presencia de antibiótico en los quesos FT, que actuaría inhibiendo o retrasando las actividades esteáricas de las bacterias lácticas, manteniendo relativamente constante la concentración de AGL en los quesos durante el segundo mes de maduración.

Los valores del índice de lipólisis obtenidos en este trabajo son similares a los señalados por Calabuig (2015) y Rivera et al. (2016), también en queso Tronchón elaborado a partir de leche cruda de cabra, para cada momento del periodo de maduración considerado (1, 30 y 60 días).

3. EFECTO DE LA PRESENCIA DE TILOSINA SOBRE EL COLOR DEL QUESO DE CABRA

La Tabla 9 muestra los valores de las diferentes variables medidas en el análisis del color, así como las magnitudes psicofísicas croma (C^*) y tono (h) de los quesos de leche de cabra, junto a los resultados del análisis de la varianza de los factores de variación estudiados.

Se observa que la presencia de antibiótico en el queso (FT) no tuvo ningún efecto significativo sobre los parámetros ensayados, a excepción de la luminosidad (L^*), que fue menor ($P < 0,05$) que la de los quesos del grupo control (FC). Sin embargo, los quesos elaborados tras la finalización del periodo de supresión (FS), presentaron valores significativamente más elevados ($P < 0,001$) para la componente b^* del color y el chroma (C^*), así como un menor valor para el tono (h).

Tabla 9. Efecto de la fabricación (concentración de tilosina) y del tiempo de maduración sobre el color del queso de cabra.

Parámetro	Fabricación				ANOVA		Tiempo de maduración (días)				ANOVA	
	Control	FT	FS	ES	F-Ratio	P	1	30	60	ES	F-Ratio	P
L^*	89,48 ^b	88,78 ^a	88,72 ^a	0,10	15,60	***	90,52 ^c	88,58 ^b	87,88 ^a	0,11	162,15	***
a^*	-0,93	-0,91	-0,92	0,01	0,24	ns	-0,25 ^c	-1,00 ^b	-1,51 ^a	0,01	1397,74	***
b^*	10,58 ^a	10,36 ^a	11,25 ^b	0,10	22,49	***	10,04 ^a	10,63 ^b	11,53 ^c	0,10	59,00	***
C^*	10,64 ^a	10,41 ^a	11,30 ^b	0,10	22,19	***	10,04 ^a	10,68 ^b	11,63 ^c	0,10	66,55	***
h	94,84 ^b	94,88 ^b	94,61 ^a	0,07	3,46	*	91,43 ^a	95,39 ^b	97,51 ^c	0,07	1609,22	***

L^* : Luminosidad; a^* y b^* : coordenadas color (CIELab); C^* : Chroma; h: Tono; FT: Final tratamiento; FS: Final periodo de supresión; ^a, ^b, ^c: diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns: no significativo.

El periodo de maduración afectó significativamente a la totalidad de variables medidas en este trabajo (Tabla 9), observándose una reducción en la componente a^* del color y de la luminosidad (L^*) del queso con el tiempo y un incremento progresivo en el resto de parámetros.

El descenso de la luminosidad (L^*) se puede atribuir a cambios en la estructura proteica (grado de hidratación de la proteína y grado de proteólisis) y a la concentración de solutos en el suero del queso, como por ejemplo los péptidos y otras sustancias nitrogenadas solubles generadas por proteólisis. Estos cambios producen una menor dispersión de la luz por parte de la estructura proteica y una mayor interacción (absorción) entre la luz y la grasa y sustancias disueltas en la fase acuosa (Rhom y Jaros, 1996). Esta tendencia también ha sido observada por otros autores en queso de cabra tipo Tronchón (Quintanilla et al., 2016) y Majorero (Fresno et al., 2012). Por el contrario, en queso Los Ibores, Delgado et al. (2011) observaron un incremento de luminosidad con el tiempo de maduración.

Respecto a las magnitudes psicométricas croma (C^*) y tono (h), ambas aumentaron con el tiempo ($P < 0,001$) alcanzando su valor máximo a los 60 días de maduración ($11,63 \pm 0,10$ y $97,51 \pm 0,10$, respectivamente). Valores elevados de C^* indican una saturación del color, por lo que parece lógico que al final del periodo de secado los quesos alcancen un color más vivo e intenso que al inicio de la maduración. Los resultados del parámetro h indican que los quesos al final de la maduración presentaron un tono más amarillento que al inicio de dicho periodo. Quintanilla et al. (2016) en queso curado tipo Tronchón, indican valores muy similares de croma y tono al final de la maduración (12,9 y 99,8, respectivamente).

4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE TILOSINA SOBRE LA TEXTURA DEL QUESO DE CABRA

La presencia de tilosina en la leche de cabra afectó significativamente a la práctica totalidad de los parámetros de textura evaluados (Tabla 10). Así, se observa que los quesos de las fabricaciones realizadas después de la aplicación del tratamiento con antibiótico (FT y FS), presentan unos valores más elevados de dureza, cohesividad y masticabilidad ($P < 0,001$), que los quesos de la fabricación control (FC). Este hecho es mucho más acusado en los quesos de la fabricación FT que presentan, además, un mayor valor de adhesividad.

Tabla 10. Efecto de la fabricación (concentración de tilosina) y el tiempo de maduración sobre los parámetros de textura del queso de cabra.

Parámetro	Fabricación				ANOVA		Tiempo de maduración (días)				ANOVA	
	Control	FT	FS	ES	F-Ratio	P	1	30	60	ES	F-Ratio	P
Dureza (N)	31,50 ^a	42,43 ^c	35,85 ^b	0,79	48,64	***	25,49 ^a	37,60 ^b	46,70 ^c	0,77	181,84	***
Adhesividad (N*s)	-1,88 ^a	-3,33 ^b	-1,96 ^a	0,31	6,98	**	-0,72 ^c	-2,65 ^b	-3,79 ^a	0,31	25,11	***
Elasticidad	0,58	0,62	0,57	0,02	1,19	ns	0,83 ^b	0,47 ^a	0,47 ^a	0,02	89,36	***
Cohesividad	0,40 ^a	0,42 ^b	0,41 ^b	0,00	10,91	***	0,70 ^c	0,29 ^b	0,24 ^a	0,00	8754,21	***
Masticabilidad (N)	6,85 ^a	10,91 ^c	8,06 ^b	0,37	30,85	***	14,98 ^b	5,39 ^a	5,46 ^a	0,37	216,30	***

N: Newton; N*s: Newton por segundo; FT: Final tratamiento; FS: Final periodo de supresión; ^{a, b, c}: diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns: no significativo.

Con respecto al tiempo de maduración y su efecto sobre la textura del queso, se observa que todos los parámetros evolucionan con el tiempo de manera similar a la indicada por otros autores (Fresno et al., 2012; Queiroga et al., 2013; Quintanilla et al., 2016), aumentando significativamente ($P < 0,001$) la dureza y la adhesividad con los días de maduración y disminuyendo progresivamente ($P < 0,001$), la elasticidad, la cohesividad y la masticabilidad del queso.

El incremento de la dureza con la maduración puede estar relacionado con la pérdida de humedad en este proceso. Las moléculas de agua dentro de la matriz tridimensional de proteínas que forman el queso, pueden debilitar su estructura de modo que, cuando el contenido de agua disminuye, la consistencia de la matriz de proteínas aumenta produciendo un textura más dura (Dimitreli y Thomareis, 2007). El aumento de la adhesividad y la disminución de la elasticidad durante la maduración pueden estar causados por la ruptura de la membrana de los glóbulos de grasa y a su vez, un menor grado de elasticidad también disminuye la resistencia a la deformación, dando lugar a una menor cohesión en el queso (Muller, 1977).

Conclusiones

V. CONCLUSIONES

La leche de cabra ordeñada un día después de la administración “extra-label” de tilosina, según los tratamientos realizados en la práctica por veterinarios del sector, presentó una concentración residual de antibiótico de $198,7 \pm 57,8 \mu\text{g}/\text{kg}$, valor muy superior al Límite Máximo de Residuos (LMR) establecido en la legislación para este antibiótico ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Los quesos obtenidos a partir de esta leche presentaron una concentración relativamente elevada de antibiótico residual a lo largo de todo el periodo de maduración (día 1: $178,9 \pm 3,3 \mu\text{g}/\text{kg}$; día 30: $140,9 \pm 11 \mu\text{g}/\text{kg}$; día 60: $86,85 \pm 4,74 \mu\text{g}/\text{kg}$), así como algunas alteraciones de su calidad, principalmente relacionadas con la textura y grado de proteólisis alcanzado durante la fase de curado.

Tras el periodo de supresión considerado (7 días), los residuos de tilosina en la leche ordeñada ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) fueron inferiores al LMR establecido y el procesado industrial de esta leche no generó residuos detectables en los quesos.

Aunque estos resultados indican que la aplicación “extra-label” de tilosina, en las condiciones descritas en este trabajo, genera una concentración de antibiótico residual en la leche de cabra relativamente baja, podría suponer un riesgo para la salud de los consumidores en determinadas circunstancias. Por ello, sería recomendable la realización de estudios similares con otras sustancias de este grupo de antibióticos, para poder valorar la inocuidad de las prácticas veterinarias en relación a la aplicación fuera de especificaciones de estas sustancias.

Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ADETUNJI, V. 2011. Effects of processing on antibiotic residues (Streptomycin, Penicillin-G and Tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. *Pak. J. Nutr.*, 10: 792-795.
- ALBENZIO, M., CAROPRESE, R., MARINO, A., MISCIÒ, A., SANTILLO, A. & SEVI, A. 2006. Characteristics of Garganica goat milk and Caciocotta cheese. *Small Rumin. Res.*, 64: 35-44.
- ALMEIDA DA COSTA, W.K., DE SOUZA, E.L., BELTRÃO-FILHO, E.M., VIEIRA, G.K. SANTI-GADELHA, T., ALMEIDA GADELHA, C.A., FRANCO, O.L., RAMOS DO EGYPTO QUEIROGA, R.C. & MAGNANI, M. 2014. Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PLoS ONE* 9(3): e93361. doi: 10.1371/journal.pone.0093361
- AMER, A.M.M., CONSTABLE, P.D., GOUDAH, A. & EL BADAWY, S.A. 2012. Pharmacokinetics of tulathromycin in lactating goats. *Small. Rum. Res.*, 108: 137-143.
- BALERDI J. 2014. "Presencia de quinolonas en queso fresco de cabra". Trabajo Fin de Carrera. ETSIAMN. Universitat Politècnica de Valencia
- BELTRÁN, M.C., BORRÀS, M., NAGEL, O., ALTHAUS, R.L. & MOLINA, M.P. 2014. Validation of receptor-binding assays to detect antibiotics in goat's milk. *J. Food Prot.*, 96: 2737-2745.
- BERRUGA M. I., MOLINA M. P., NOVES B., ROMAN M., MOLINA A. 2007a. "In vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk". *Milchwissenschaft*, 62: 303-305.
- BERRUGA M. I., BATTACONE G., MOLINA M. P., ROMAN M., MOLINA A. 2007b. "Influence of beta-lactams on Manchego cheese manufacture". 148. 5th International Symposium on the challenge to sheep and goats milk sectors. International Dairy Federation, Alghero, Italia.
- BERRUGA, M.I., LOZOYA, S., RUBIO, R., CASTRO N. Y MOLINA, A. 2008. Estudio sobre las posibles causas de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche de ovino y caprino .Informe técnico. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. 102 pp.
- BHOSALE, S., KAHATE, P.A., THAKARE, V.M. & GUBBAWAR, S.G. 2009. Effect lactation on physicochemical properties of local goat milk (India). *Vet World*, 2: 17-19.
- BUENO, F. J. 2009. Historia, tradición y salud. En: Los quesos de la Comunidad Valenciana. Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Valencia.19-34.
- CALABUIG, M. 2015. "Efecto de la presencia de quinolonas en la leche de cabra sobre las características del queso curado". Trabajo Fin de Carrera. ETSIAMN. Universitat Politècnica de Valencia.
- CAPELLAS, M., MORMUR, M., SENDRA, E. & GUAMIS, B. 2001. Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goat's milk cheese (Mato). *Int. Dairy J.*, 11: 165-173.
- CLOTHIER, K.A., KINYON, J.M. & GRIFFITH W. 2012. Antimicrobial susceptibility patterns and sensitivity to tulathromycin in goat respiratory bacterial isolates. *Vet. Microbiology*, 156:178-182.
- CONTRERAS, A., SIERRA, D., SÁNCHEZ, A., CORRALES, J.C., MARCO, J.C., PAAPE, M.J. & GONZALO, C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin. Res.*, 68: 145-153.
- COGAN T. M. 1972. "Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics". *Applied and Environmental Microbiology*, 23: 960-965.

- DEBACKERE, M. 1995. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in relation to their residues in milk. IDF Special Issue Nº 9505, 41-53. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- DECISIÓN 2002/657/EC del Consejo del 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/EC del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial L173: 30-31.
- DELGADO, F.J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., CAVA, R. & RAMÍREZ, R. 2011. Changes in microbiology, proteolysis, texture and sensory characteristics of raw goat milk cheeses treated by high-pressure at different stages of maturation. LWT-Food Sci. Tech., 48: 268-275.
- DEMOLY P., ROMANO A., 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. Curr. Allergy Asthm. R., 1:9-14.
- DIMITRELI, G. & THOMAREIS, A.S. 2007. Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. J. Food Engin, 79: 1364-1373.
- DIRECTIVA 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. Diario Oficial nº L 125, 10-32.
- DIRECTIVA 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Comm.,L 311:1-66.
- DIRECTIVA 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Union, L136:58-84.
- DURAN, L., SÁNCHEZ, C., PALMERO, J., CHAPARRO, L., GARCÍA, T. Y SÁNCHEZ, E. 2010. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. Zootecnia Trop., 28: 467-475.
- EPRUMA. 2008. Best-practice framework for the use of antimicrobials in food-producing animals in the EU. European Platform for the Responsible Use of Medicines in Animals (EPRUMA). Brussels, Belgium. <http://www.epruma.eu/publications/allpublications.html> (Fecha de acceso: 21-06-2016).
- FERRANDINI, E., LÓPEZ, M.B., CASTILLO, M. & LAENCINA, J. 2011. Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. Food Chem., 124: 583-588.
- FERRINI M.A., TRENTA S., MANNONI S., ROSATI R., CONI, E. 2010. Depletion of long-acting ampicillin in goat milk following intramuscular administration. J. Agric. Food Chem., 58:12199-12203.
- IDF. 2013. IDF Guide to Prudent Use of Antimicrobial Agents in Dairy Production. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium. <http://www.fil-idf.org/Public/PublicationsFolder.php?ID=27123> (Fecha de acceso: 16-06-2016).
- FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L., COGAN, T.M. & GUINEE, T.P. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers Inc., Madison, USA. 588 pp.

- FRANCO, I., PRIETO, B., BERNARDO, A., GONZÁLEZ, J. & CARBALLO, J. 2003. Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *Int. Dairy J.*, 13: 221-230.
- FRESNO, M. & ÁLVAREZ, S. 2012. Chemical, textural and sensorial changes during the ripening of Majorero goat cheese. *Int. Dairy Techn.*, 65: 393-400.
- GOURSAND L. 1991. "Composición y propiedades físico-químicas en leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra". Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- GUINEE, T.P. & MCSWEENEY, P. L. 2006. Significance of milk fat in cheese. In: *Advanced dairy chemistry. Volume 2. Lipids*. 3ª Ed. Springer. Nueva York, USA. 377-427.
- GRUNDWALD L. Y PETZ M. 2003. "Food processing effects on residues: penicillins in milk and yogurt". *Analytica Chimica Acta*, 483: 73-79.
- JARAMILLO, D., ZAMORA, A., GUAMIS, B., RODRÍGUEZ, M. & TRUJILLO, A.J. 2008. Cheesemaking aptitude of two Spanish dairy ewe breeds: Changes during lactation and relationship between physico-chemical and technological properties. *Small Rumin Res.*, 78: 48-55.
- LUCEY, J.A., JOHNSON, M.E. & HORNE, D.S. 2003. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.*, 86: 2725-2743.
- MAGRAMA. 2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medios Ambiente. Caracterización del sector ovino y caprino en España (Año 2013). <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos> (fecha de acceso: 27-6-16).
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, M.C., JUÁREZ, M. & RAMOS, M. 1992. Biochemical characteristics of three types of goat cheese. *J. Dairy Sci.*, 75: 1747-1752.
- MAS, M.J., TIMÓN, E. & GONZÁLEZ, C. 1991. Queso Ibores: Caracterización productiva, físicoquímica y microbiológica. *Arch. Zootec.*, 40: 103-113.
- MÄYRÄ-MÄKINEN A. 1995. "Technological significance of residues for the dairy industry. 136-143. En: *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*". IDF Special Issue. 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- MCSWEENEY, P.L. & SOUSA, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80: 293-324.
- MENZIES, P.I. & RAMANOON, S.Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 17: 333-358.
- MMBENGWA, V.M., SCHWALBACH, L.M., GREYLING, J.P.C. & FAIR, M.D. 2000. Milk production potential of South African Boer and Nguni goats. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 30: 76-77.
- MOLINA, A., MOLINA, M.P., ALTHAUS, R.L. & GALLEGRO, L. 2003. Residue persistence in sheep milk following antibiotic therapy. *Vet. J.*, 165:84-89.
- MOUROT D., LOUSSOUARN S., 1981. "Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire". *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 157: 175-177.
- MULLER, H.G., 1977. *Introducción a la reología de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España. 174 pp.
- ORDEN de 23 de diciembre de 2008, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que publica la reglamentación de calidad del queso de cassoleta, queso blanquet, queso de la Nucia o de pastel, queso de servilleta y queso tronchón, para su distinción con la marca de CV. [2008/15122].

- PAPICH M., RIVIERE J. 2002. Cloranfenicol y derivados, macrólidos, lincosamids y otros antibióticos. 929-960. En: Farmacología y terapéutica veterinaria. 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- PARK, Y.W. 2008. Goat milk: products, manufacturing technology, chemical composition and marketing. In: Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. Blackwell Publishers. Ames, Iowa and Oxford, England. 92-103.
- PARK, Y.W., JUÁREZ, M., RAMOS, M. & HAENLEIN, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68: 88-113.
- PENGOV, A., KIRBIS A. 2009. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. *Anal. Chim. Acta*, 637:13-17.
- PERRETEEN V., TEUBER M. 1995. "Antibiotic resistant bacteria in fermented dairy products –a new challenge for raw milk cheese". 144-148. In: Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF Special Issue 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- PHILLIPS, I., CASEWELL M., COX T., DE GROOT B., FRIIS C., JONES R., NIGHTINGALE C., PRESTON R., WADDELL J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53:28-52.
- PINHO O., MENDES E., ALVES M. M., FERREIRA, I.M. 2004. "Chemical, physical and sensorial characteristics of Terrincho ewe cheese: changes during ripening and intravarietal comparison". *Journal of Dairy Science*, 87: 249-257.
- QUEIROGA, R.D., SANTOS, B M., GOMES, A.M., MONTEIRO, M.J., TEIXEIRA, S.M., DE SOUZA, E.L., DÍAS, C.J. & ESTÉVEZ, M.M. 2013. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT-Food Sci. Tech.*, 50: 538-544.
- QUINTANILLA, P., RIVERA, N., BELTRÁN, M.C., ESCRICHE, I. Y MOLINA, M.P. 2016. Caracterización del queso Tronchón elaborado con leche cruda de cabra. Parte II: color y textura durante la maduración. XLI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovino y Caprino. Talavera de la Reina. Libro de congreso: 259-263.
- RAWYA, A.A.S. & AHMED, K.A. 2014. Physicochemical characteristics of Damascus (Shami) Cyprus goats milk in different lactation periods. *Int. J. Lib. Arts Social Sci.*, 2: 67-72.
- RAYNAL-LJUTOVAC, K., GABORIT, P. & LAURET A. 2005. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Rumin. Res.*, 60: 167-177.
- REAL DECRETO 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*, nº 239: 34717- 34720.
- REAL DECRETO 752/2011 de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra. *Boletín Oficial del Estado* Nº 137: 58609-58631.
- REGLAMENTO Nº 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial L 31: 1-24.*
- REGLAMENTO Nº 852/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial L 139: 1-54.*

- REGLAMENTO Nº 853/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial L 139: 55-205.
- REGLAMENTO Nº 854/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Diario Oficial L 139: 206-319.
- REGLAMENTO Nº 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen procedimientos para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) Nº 2377/90 del consejo y se modifican las Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) Nº 26/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial L 152: 11-22.
- REGLAMENTO Nº 37/2010/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial L 15: 1-72.
- RIVERA, N., QUINTANILLA, P., ROMERO, T., BELTRÁN, M.C. Y MOLINA, M.P. 2016. Caracterización del queso Tronchón elaborado con leche cruda de cabra. Parte I: parámetros fisicoquímicos durante la maduración. XLI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovino y Caprino. Talavera de la Reina. Aceptado para su publicación. Libro de congreso: 253 - 258.
- RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. Small Ruminant Research, 2010, vol. 89, no 2, p. 225-233.
- ROHM, H. & JAROS, D. 1996. Colour of hard cheeses 1. Description of colour properties and effects of maturation. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A., 203: 241-244.
- ROCA, M., CASTILLO, M., MARTÍ, P., ALTHAUS, R.L. & MOLINA, M.P. 2010. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. J. Agric. Food Chem., 58: 5427-5431.
- ROMERO, T., BELTRÁN, M.C., RODRÍGUEZ, M., MARTÍ DE OLIVES, A. & MOLINA, M.P. 2013. Short communication: Goat colostrum quality: Litter size and lactation number effects. J. Dairy Sci. 96: 7526-7531.
- SALDO, J., MCSWEENEY, P.L.H., SENDRA, E., KELLY, A.L. & GUAMIS, E. 2002. Proteolysis in caprine cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. Int. Dairy J., 12: 35-44.
- SALVADOR, A., MARTÍNEZ, G., ALVARADO, C. Y HAHN, M. 2006. Composición de leche de cabras mestizas Canarias en condiciones tropicales. Zootecnia Trop., 24: 307-320.
- SANDERS, P., BOUSQUET-MELOU A., CHAUVIN C., TOUTAIN P.L. 2011. Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. INRA Prod. Anim., 24:199-204.
- SANZ CEBALLOS, L., RAMOS MORALES, E., DE LA TORRE ADARVE, G., DÍAZ CASTRO, J., PÉREZ MARTÍNEZ, L. & SANZ SAMPELAYO, M.R. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. J. Food Compos., 22: 322-329.
- SENDRA, E. & SALDO, J. 2004. Servilleta cheese proteolysis, colour and texture. Milchwissenschaft. 56: 34-37.
- SORIANO, J. 2009. Características nutricionales de los quesos en el marco de la dieta mediterránea. En: Los quesos de la Comunidad Valenciana. Ed. Fundación Valenciana de estudios Avanzados. Valencia. 19-34

- SORYAL, K., BEYENE, F.A., ZENG, S.S., BAH, B. & TESFAI, K. 2005. Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. *Small Rumin. Res.*, 58: 275-281.
- TOLLEFSON L., KARP B.E. 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med. Maladies Infec.*, 34:514-521.
- TROBOS M., LESTER C. H., OLSEN J. E., FRIMODT-MOLLER N., HAMMERUM A.M. 2009. "Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 80-86.
- VETERINDUSTRIA. 2012. Guía de productos zoonos sanitarios 2011-2012. 12ª ed. Ed. Veterindustria, Madrid.
- ZORRAQUINO, M.A., ROCA, M., FERNÁNDEZ, N., MOLINA, M.P. & ALTHAUS, R.L. 2008. Heat inactivation of β -lactam antibiotic in milk. *J. Food Prot.*, 71: 1193-1198.