



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## “EFECTO DE LA PRESENCIA DE OXITETRACICLINA EN LA LECHE DE CABRA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL QUESO DE TRONCHÓN”

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA  
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: MARINA CORNACCHINI

TUTOR/A ACADEMICO: M<sup>a</sup> ISABEL ESCRICHE ROBERTO  
COTUTOR/A: DRA. M<sup>a</sup> PILAR MOLINA PONS

*Curso Académico: 2016-2017*

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2017

# **EFFECTO DE LA PRESENCIA DE OXITETRACICLINA EN LA LECHE DE CABRA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL QUESO TRONCHÓN**

Cornacchini, M.<sup>1</sup>; Quintanilla, P.<sup>2</sup>; Hernando M. I.<sup>3</sup>; Molina, M. P.<sup>2</sup>; Escriche, I.<sup>1</sup>

## **RESUMEN**

El objetivo de este estudio ha sido analizar el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de oxitetraciclina en la leche de cabra, sobre el proceso de elaboración y características del queso de Tronchón. Para ello se realizaron tres fabricaciones de queso curado a partir de leche cruda de cabra sin antibiótico (control) y con adición de tres concentraciones de oxitetraciclina equivalentes a 0,5 Límite Máximo de Residuos (LMR) (50 µg/kg), LMR (100 µg/kg) y 2 LMR (200 µg/kg).

En el proceso de fabricación se observó un retraso significativo en la acidificación de los quesos con presencia de oxitetraciclina. Sin embargo, los parámetros relacionados con la composición, fisicoquímicos, color, reológicos y sensoriales analizados en los distintos grupos de quesos, no manifestaron diferencias significativas en el queso curado de 60 días respecto al grupo control, sin antibiótico. No obstante, el contenido de ácidos grasos libres (AGL) fue significativamente mayor en los quesos control frente a los quesos con antibiótico, reflejando una mayor lipólisis, que también se pudo observar en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. La cantidad de oxitetraciclina residual en los quesos maduradores fue inferior al LMR establecido para la leche. Por lo que la presencia de oxitetraciclina en la leche de cabra en cantidades inferiores al LMR no parece suponer un riesgo para la salud pública.

**PALABRAS CLAVES:** Leche de cabra, oxitetraciclina, queso Tronchón.

## **RESUM**

L'objectiu d'aquest estudi ha estat analitzar l'efecte de la presència de diferents concentracions de oxitetraciclina en la llet de cabra, sobre el procés d'elaboració i característiques del formatge de Tronchón. Per a això es van realitzar tres fabricacions de formatge curat a partir de llet crua de cabra sense antibiòtic (control) i amb addició de tres concentracions de oxitetraciclina

---

<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería Alimentos para el desarrollo (IAD)-Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València

<sup>3</sup>Grupo de Microestructura y Química de Alimentos. Departamento de Tecnología de los Alimentos. Universitat Politècnica de València

equivalents a 0,5 Límit Màxim de Residus (LMR) (50 µg / kg), LMR (100 µg / kg) i 2 LMR (200 µg / kg).

En el procés de fabricació es va observar un retard significatiu en l'acidificació dels formatges amb presència de oxitetraciclina. No obstant això, els paràmetres relacionats amb la composició, fisicoquímics, color, reològics i sensorials analitzats en els diferents grups de formatges, no van manifestar diferències significatives en el formatge curat de 60 dies respecte al grup control, sense antibiòtic. No obstant això, el contingut d'àcids grassos lliures (AGL) va ser significativament major en els formatges control davant els formatges amb antibiòtic, reflectint una major lipòlisi, que també es va poder observar en les imatges obtingudes per microscòpia electrònica de rastreig. La quantitat de oxitetraciclina residual en els formatges maduradors va ser inferior al LMR establert per a la llet. Pel que la presència de oxitetraciclina en la llet de cabra en quantitats inferiors al LMR no sembla suposar un risc per a la salut pública.

PARAULES CLAU: Llet de cabra, oxitetraciclina, formatge Tronchón.

## **ABSTRACT**

The effect of different oxytetracycline concentrations presence in goat milk is analyzed during Tronchón cheese production and in the final product characteristics. For this purpose three cured type cheese (control) are manufactured from raw goat milk without antibiotics, adding different concentrations of oxytetracycline for each case: 0,5 MRL (50 mg/kg); 1 MRL (100 mg/kg) and 2 MRL (200 mg/kg)

A significant cheese acidification delay is observed during the manufactory process with oxytetracycline presence. Parameters related to general composition, physicochemical, color, rheological and organoleptic of the final product are not observed to be different from sixty day cured cheese manufactured without antibiotics. Free fatty acids content is observed to be significantly higher in control cheese than in sixty day cured cheese manufactured with antibiotics. As a consequence, microscopy electronic scanning reflects a higher lipolysis in control cheese. Residual oxytetracycline content in matured cheese is inferior to the established MRL in Europe for milk, demonstrating that does not represent a potential public health risk.

KEY WORDS: Goat milk, oxytetracycline, Tronchón cheese.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de antibióticos para el tratamiento de patologías infecciosas del ganado caprino lechero, ha contribuido al control de enfermedades y al bienestar nutricional del ganado. Sin embargo esta práctica puede tener como consecuencia la presencia de residuos de estos fármacos en la leche, que pueden causar alergias, alteraciones en la flora intestinal y desarrollo de resistencia bacteriana (EFSA, 2016). Además, la generación de resistencia a los antimicrobianos en los seres humanos es uno de los problemas de salud pública actualmente más importantes (OMS, 2016), siendo una de las causas las malas prácticas en el uso de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas del ganado (Oliver et al., 2011; EFSA, 2016).

También la presencia de antibióticos en la leche puede ocasionar efectos tecnológicos negativos, debido a que pueden afectar a los procesos bacterianos requeridos en la elaboración de productos lácteos fermentados, como es el caso de los quesos (Berruga et al., 2007). Las bacterias utilizadas para la elaboración de los quesos son, en la mayoría de los casos, sensibles a las sustancias antimicrobianas, pudiendo su crecimiento inhibirse parcial o completamente (Packham et al., 2001; Bradley y Green, 2009; Berruga et al., 2016) lo que puede causar un retraso en el descenso del pH en los quesos prensados (Berruga et al., 2007) y un deterioro de las propiedades organolépticas del producto final.

Además, los tratamientos térmicos empleados en la industria láctea, en general, no logran inactivar los residuos de antibióticos presentes en la leche (Zorraquino et al., 2008). Tampoco el proceso tecnológico garantiza la eliminación de estas sustancias y, por consiguiente, cantidades variables de antibióticos pueden permanecer en los productos lácteos (Cabizza et al. 2016). De hecho Adetunji (2011) encontró residuos de bencilpenicilina, estreptomycin y tetraciclina en quesos comerciales.

Algunos autores han estudiado el comportamiento de los antibióticos durante la elaboración de queso a partir de leche con residuos de estas sustancias. Así Berruga et al. (2005) realizaron un estudio sobre la presencia de antibióticos en el lactosuero resultante de la elaboración de queso Manchego, a partir de leche de oveja con distintas concentraciones de betalactámicos indicando una posible retención de algunos antibióticos en la cuajada. Cabizza et al. (2016), estudiaron la transferencia de oxitetraciclina de la leche al queso curado también de oveja, señalando que aproximadamente el 60% de la cantidad total de antibiótico añadida en la leche se recuperó en la matriz de queso. También, Giraldo et al., (2017) indicaron que antibióticos como los aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas presentan una elevada susceptibilidad de quedar retenidas en la cuajada.

Por otra parte, las tetraciclinas, son una familia de antibióticos con amplio espectro de actividad antimicrobiana, ya que presentan actividad contra una extensa gama de bacterias gram positivas y gram negativas. Son sustancias bacteriostáticas que inhiben la síntesis de proteínas y, consecuentemente, el

crecimiento y multiplicación de los microorganismos (Chopra y Roberts, 2001). Su uso, en especial la oxitetraciclina se considera habitual en el ganado caprino lechero, para el tratamiento de patologías tales como mamitis e infecciones gastrointestinales entre otras (Berruga et al., 2008).

La Unión Europea, para asegurar la inocuidad alimentaria, ha establecido unos Límites Máximos de Residuos (LMR) para diferentes sustancias farmacológicamente activas (Reglamento CE nº 37/2010) fijándose, para todas las tetraciclinas de uso veterinario en leche de diferentes especies, un LMR de 100 µg/kg. Sin embargo, en la actualidad no se han regulado límites para los productos derivados de la leche.

Con respecto a la producción de leche de cabra, según la FAO (FAOSTAT, 2017), en España, la producción de leche de cabra fue de 418.098 toneladas en el año 2015. Tradicionalmente esta leche se destina, en su mayoría, a la elaboración de productos derivados, en especial quesos. A nivel mundial Europa representa una parte importante de la producción de queso de cabra (35%), siendo Francia (44,2%), Grecia (21,8%) y España (18,3%) los principales países europeos productores. Alguno de los quesos de cabra elaborados en España se encuentran amparados por marcas de calidad: Denominaciones de Origen Protegidas (DOP), Indicaciones Geográficas protegidas (IGP), etc. Actualmente, en España, se elaboran 26 quesos con DOP, de los cuales 6 de ellos son únicamente de leche de cabra: Camerano, Murcia, Murcia al vino, Ibores, Majorero y Palmero (Martínez et al. 2011).

La Comunidad Valenciana posee una larga tradición en la elaboración de quesos, fundamentalmente quesos frescos fabricados con leche de vaca y cabra que se comercializan en mercados locales. De los quesos elaborados en esta comunidad, cinco de ellos (Blanquet, Cassoleta, La Nucia, Servilleta y Tronchón) se encuentran reglamentados para su distinción, con la Marca de Calidad CV (DOCV Nº 5924, 2008). Las características de estos quesos se encuentran especificadas en el RD 1113/2006 (BOE 239 de 6 de octubre de 2006) y los valores mínimos de composición se regulan también en el citado Real Decreto.

Entre los quesos valencianos, destaca el queso de Tronchón que puede ser elaborado con leche de oveja y/o cabra con diferentes tiempos de maduración. Es un queso de coagulación enzimática, con forma cilíndrica o troncocónica, con las dos caras hendidas como un volcán, con un dibujo grabado en forma de flor (Bueno, 2009).

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar el efecto de la presencia de oxitetraciclina en la leche de cabra sobre el proceso de elaboración y las características del queso de Tronchón, estudiando las posibles modificaciones fisicoquímicas, reológicas, microestructurales y sensoriales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño experimental**

La fabricación de los quesos se llevó a cabo con leche de cabras Murciano-Granadinas del rebaño experimental de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Los animales no habían sido tratados con antibióticos, ni habían recibido alimentación medicada, antes o durante el tiempo que duró el experimento. La leche se recogió tras el ordeño mecánico del rebaño del tanque de refrigeración de la granja, el mismo día de la elaboración del queso, y se utilizó inmediatamente.

Las elaboraciones se realizaron por triplicado en la planta Piloto de la UPV, durante tres semanas consecutivas. Cada fabricación consistía en la elaboración de cuatro lotes de queso curado de Tronchón a partir de leche de cabra cruda, sin antibiótico (grupo control) o con adición de oxitetraciclina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España) a diferentes concentraciones: 50 µg/kg (0,5 LMR), 100 µg/kg (LMR) y 200 µg/kg (2 LMR).

Tras el periodo de maduración (60 días), se realizaron de forma inmediata los análisis de color, textura, microestructura por Cryo-SEM y sensorial. Para el resto de análisis las muestras se envasaron a vacío en distintas porciones de aproximadamente 30 g y se congelaron a -20°C.

### **Elaboración del queso**

El queso de Tronchón se elaboró siguiendo el proceso tradicional descrito por Rivera et al. (2016). En la figura 1 se observa el diagrama de flujo correspondiente a la elaboración de dicho queso.

### **Análisis fisicoquímicos**

#### **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL QUESO**

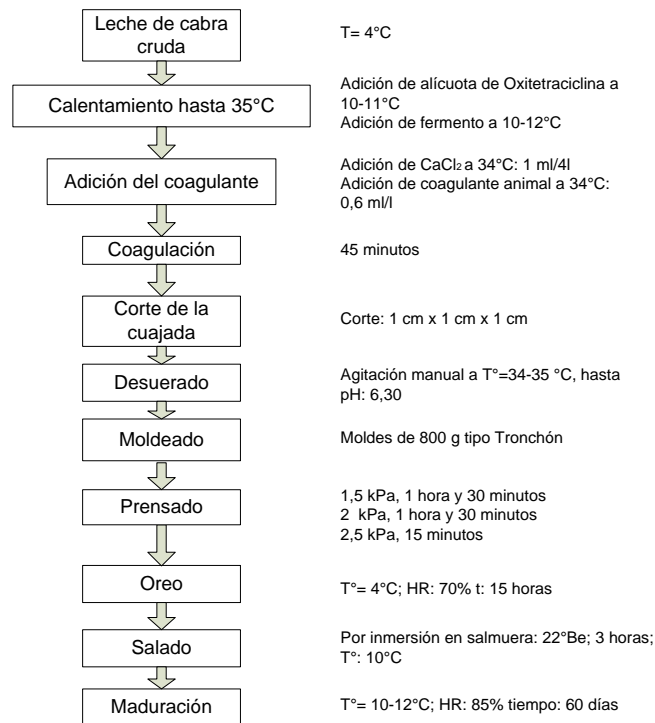
La composición química de los quesos se analizó por infrarrojo cercano NIRS mediante el equipo Food Scan (Foss, Hillerød, Dinamarca) según el protocolo presentado por Quintanilla et al. (2016).

#### **pH**

El pH se determinó mediante un pH-metro Crison modelo Basic 20 (Crison, Barcelona), con un electrodo de penetración.

#### **PROTEÓLISIS**

El análisis del índice de proteólisis se realizó según el método descrito por Folkertsma y Fox (1992). En donde en una primera fase se obtiene la fracción nitrogenada soluble y en la segunda se valoran los aminoácidos libres (AAL) mediante el reactivo de Cadmio-ninhidrina.



**FIGURA 1:** Proceso de elaboración de tipo artesanal del queso Tronchón

## LIPÓLISIS

El índice de lipólisis se analizó siguiendo la metodología que evalúa el contenido en ácidos grasos libres (AGL) descrita por Núñez et al. (1986) y Rivera et al. (2016)

## COLOR

La caracterización objetiva del color se realizó mediante un espectrocolorímetro (CM 3600D, Konica Minolta Business Solutions Spain S.A. Madrid) según el protocolo analítico indicado por Quintanilla et al. (2016).

## TEXTURA

Se realizaron análisis de perfil de textura (TPA) utilizando un texturómetro TA. XT. plus (Stable Micro Systems, Godalming, UK). Los parámetros obtenidos fueron: dureza, elasticidad, adhesividad, cohesión y masticabilidad empleándose el procedimiento presentado por Quintanilla et al. (2016).

## **Análisis por Microestructura Electrónica de Barrido**

### **MICROESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJA TEMPERATURA (Cryo-SEM)**

Para este análisis de microestructura las muestras de queso se cortaron en pequeños cubos de 0,5 cm de lado y se sumergieron en N<sub>2</sub> nieve a temperatura  $\leq -210$  °C y se transfirieron rápidamente a un Cryo - Trans System CT 1500 C acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410 que trabaja en condiciones de vacío ( $7 \times 10^{-4}$  Pa) a una temperatura de -130 °C. En el Cryo - Trans las muestras se fracturaron a -180 °C con la ayuda de un pequeño punzón, tras lo cual, se introdujeron en la cámara del microscopio para ser sublimadas a -90°C, con el fin de eliminar el posible exceso de escarcha superficial. Antes de la observación de las muestras en el microscopio, éstas se metalizaron con oro (0,2 kPa, 30 s), proceso que se realizó en el Cryo - Trans. La observación de las muestras se realizó a 15 kV y 15 mm de distancia de trabajo.

### **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)**

De cada una de las muestras, se prepararon cubos de 0,5 cm de lado que se congelaron a -80 °C y se liofilizaron (Lyoquest 55, Telstar, Terrassa, Barcelona, España). Posteriormente, las muestras se recubrieron con platino a vacío, y se observaron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (modelo Ultra 55, FESEM Zeiss, Oberkochen, Alemania).

## **Análisis Sensorial**

Se realizó un análisis sensorial con la finalidad de evaluar si existían diferencias perceptibles entre los quesos fabricados a partir de leche que contenía antibiótico y los quesos control (sin antibiótico): todos ellos madurados durante 60 días.

Con este fin, un panel de 16 catadores entrenados evaluó el grado de aceptación de los quesos en relación a diferentes atributos: apariencia, textura visual, olor, color y aceptación global. Estos atributos se evaluaron utilizando escalas hedónicas no estructuradas, de 10 cm de longitud del agrado (No me gusta nada/ Me gusta mucho) en los extremos las mismas (UNE-ISO 4121). Los jueces respondieron marcando en la línea la posición correspondiente a la intensidad percibida. No se incluyeron atributos relacionados con la degustación del producto, debido a la presencia del antibiótico en las muestras. Las pruebas se llevaron a cabo en la sala de catas del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IAD) que cumple con la norma UNE 87-004-79.



## **Análisis cuantitativo del antibiótico**

La cuantificación de la cantidad residual de oxitetraciclina en los quesos, se llevó a cabo en el instituto Lactológico de Lekunberri (Pamplona, Navarra, España) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Dicho laboratorio está acreditado por ENAC (UNE-EN-ISO-IEC 17.025) para el análisis de residuos de antibióticos en productos lácteos.

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.II. (Stat Point Technologies, Inc., Warrenton, VA, Estados Unidos). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) multifactor para evaluar el efecto de los factores “tiempo” y de la “concentración de oxitetraciclina” en la evolución del pH durante el proceso de elaboración y un ANOVA simple para evaluar el efecto “concentración de antibiótico” en las características de composición, fisicoquímicas, reológicas y sensoriales del queso de Tronchón.

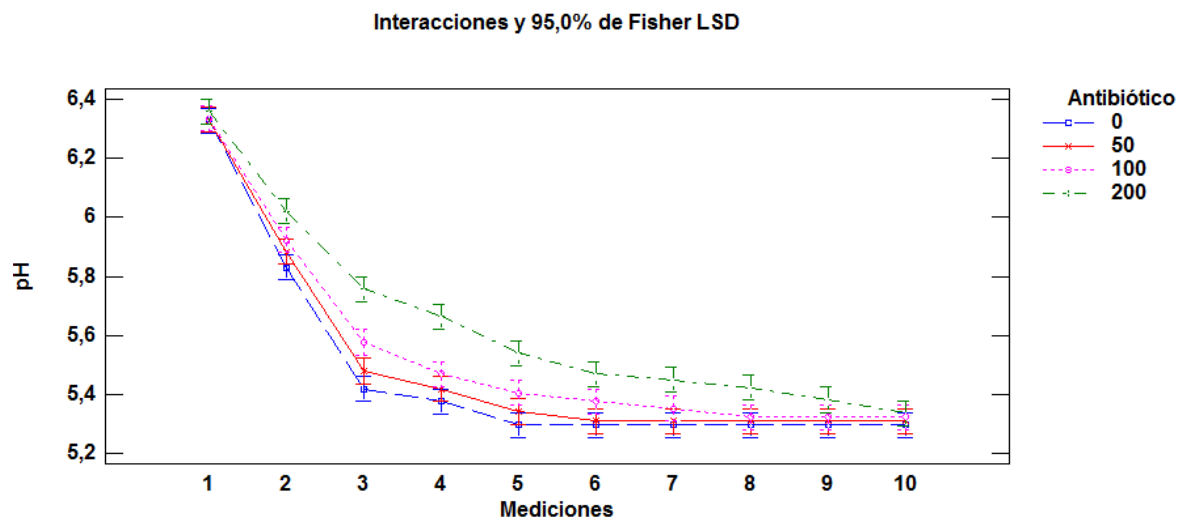
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Evolución del pH de la cuajada en el proceso de fabricación del queso**

Con la finalidad de evaluar la actividad de las bacterias ácido-lácticas durante la etapa de prensado de la cuajada, se realizaron mediciones del pH hasta alcanzar el pH de 5,30 (necesario para continuar con la siguiente etapa del proceso, el salado). Las mediciones se realizaron antes de que los quesos entraran en la etapa de prensado, durante el prensado y después de esta etapa cada 15 minutos, si todavía no habían alcanzado el pH.

Se ha realizado un ANOVA multifactor (tiempo/temperatura) para evaluar la significación estadística de la variación del pH. De este análisis se deduce que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las distintas concentraciones de antibiótico y también entre los distintos tiempos. La figura 2 muestra el gráfico de interacciones del ANOVA. En ella se puede observar que los quesos control llegan al pH requerido en la medición 5, que corresponde a 250 minutos. Para los quesos con oxitetraciclina el tiempo necesario para que se alcance el pH aumenta progresivamente con la concentración de antibiótico presente. Con una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (0,5 LMR) tardaron 265 minutos (medición 6), con 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (LMR) 352 minutos (medición 8) y finalmente los de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (2 LMR) alcanzaron el pH a los 435 minutos (medición 10), retrasándose 15, 102 y 185 minutos respectivamente en relación a los quesos sin antibiótico (control).

A partir de los resultados, se pone en evidencia el efecto negativo de la presencia de oxitetraciclina sobre el cultivo estárter, inhibiendo la disminución del pH en la etapa de prensado y retrasando el proceso de elaboración. Este resultado coincide con lo observado por Cabizza, et al., (2017) en queso de leche de oveja. Estos autores señalaron un retraso en la acidificación de 60 minutos como consecuencia de la presencia de oxitetraciclina al LMR. Del mismo modo, Berruga et al. (2007), también detectaron el retraso del descenso de pH en queso Manchego, debido a la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos. A su vez, Adetunji (2011), manifestó que los residuos de estreptomycin, penicilina-G y tetraciclina interferían en el normal desarrollo del cultivo estárter retrasando la producción de queso blando y yogur.



**FIGURA 2.** Evolución del pH durante la etapa de acidificación en prensa de los quesos de Tronchón. Interacción del ANOVA (factores tiempo y concentración de antibiótico). Quesos elaborados con leche sin adición de antibiótico y leche fortificada con oxitetraciclina: 50 µg/kg (0,5 LMR), 100 µg/kg (LMR), 200 µg/kg (2 LMR). Mediciones: 1 (0 min), 2 (90 min), 3 (191 min), 4 (233 min), 5 (250 min), 6 (265 min), 7 (314 min), 8 (352 min), 9 (385 min), 10 (435 min).

### **Influencia de la concentración de oxitetraciclina en las características del queso Tronchón**

#### **COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS QUESOS**

El efecto de la concentración de antibiótico sobre la composición de los quesos a los 60 días de maduración se refleja en la tabla 1. En ella se muestran los valores de composición (sólidos totales, materia grasa, proteína, humedad y sal), así como los valores de pH de los quesos fabricados con leche sin adición

de esta sustancia y de los quesos con diferentes concentraciones de oxitetraciclina. Además, en la misma tabla se indica el resultado del ANOVA para el factor concentración de antibiótico, el cual no resulta significativo para ninguno de los parámetros composicionales analizados ni para el pH al final de la maduración. Así mismo, Cabizza et al. (2016) no encontró diferencias significativas, en cuanto al pH medido en quesos curados de oveja, entre los grupos control y los quesos elaborados con adición en la leche de oxitetraciclina al LMR. Tampoco Calabuig (2015) observó diferencias significativas para los parámetros composicionales en queso curado de cabra, entre los quesos control y aquellos con presencia de quinolonas (enrofloxacina y ciprofloxacina).

**TABLA 1.** Valores de composición (media y desviación estándar) de los quesos elaborados con leche sin antibiótico y con oxitetraciclina madurados 60 días.

| Parámetro                | Oxitetraciclina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |              |              |              | ANOVA   |         |
|--------------------------|---|--------------|--------------|--------------|---------|---------|
|                          | 0   | 50           | 100          | 200          | F ratio | P valor |
| <b>Composición</b>       |   |              |              |              |         |         |
| Sólidos totales (g/100g) | 65,58 (1,06)                                | 65,49 (0,66) | 66,45 (0,56) | 65,82 (0,78) | 3,57    | n.s.    |
| Materia grasa (g/100g)   | 35,96 (1,52)                                | 35,95 (1,54) | 35,69 (1,61) | 35,32 (1,29) | 0,49    | n.s.    |
| Proteína (g/100g)        | 24,51 (1,76)                                | 24,70 (1,55) | 26,63 (3,64) | 25,47 (1,45) | 2,13    | n.s.    |
| Humedad (g/100g)         | 34,41(1,06)                                 | 34,51(0,66)  | 33,70 (0,46) | 34,18(0,79)  | 2,20    | n.s     |
| Sal (g/100g)             | 2,39(0,09)                                  | 2,23(0,16)   | 2,17(0,13)   | 2,12(0,08)   | 10,60   | n.s     |
| pH                       | 5,12 (0,03)                                 | 5,13 (0,02)  | 5,22 (0,05)  | 5,24 (0,03)  | 40,61   | n.s     |

Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. n.s = No existen diferencias significativas.

Otros autores han presentado valores similares de composición, Rivera et al., (2016) en queso Tronchón, hallaron los siguientes valores: materia grasa: 36,7 (1,15) g/100g, proteína: 25,1 (1,3) g/100g, sal: 2,2 (0,1) g/100g y pH: 5,22 (0,10). A su vez Salvador et al. (2014), en quesos curados elaborados con leche de cabra de raza Murciano Granadina presentaron un pH de 5,22 a los 60 días de maduración. En otros quesos de cabra, como el queso Majorero con 60 días de maduración, los valores de humedad fueron también similares: 36,42 (3,89) g/100 g al igual que los valores de pH: 5,30 (0,17), mientras que los valores de grasa y proteína resultaron más elevados: 51,10 (3,50) y 34,4 (3,32) g/100 g respectivamente (Fresno y Álvarez, 2012).

## PROTEÓLISIS

El nivel de proteólisis, fenómeno que tiene lugar durante la maduración de los quesos, se puede evaluar mediante el análisis del contenido total de aminoácidos libres (AAL). En la tabla 2 se ven reflejados los valores medios y desviaciones estándar de AAL, expresados como mg de leucina/g de queso, así

como también los resultados de ANOVA en las muestras analizadas. A partir de los resultados, se observa que no existen diferencias significativas entre los quesos elaborados sin adición de antibiótico y con distintas concentraciones de oxitetraciclina. Sin embargo se obtuvieron valores ligeramente mayores para los quesos control que para los quesos con antibiótico. Cabizza et al., (2016), tampoco obtuvo diferencias significativas en el grado de proteólisis entre los quesos control y los quesos de leche de oveja con presencia de oxitetraciclina al LMR. Así mismo, Calabuig, (2015) observó una tendencia similar a los 60 días de maduración, indicó que el aumento en la concentración de AAL a lo largo del periodo de maduración, se ve más afectado por el proceso de maduración que por la presencia del antibiótico. Los valores obtenidos son ligeramente mayores, a los obtenidos por Rivera et al. (2016) de 1,82 (0,32) mg de leucina/g de queso también para el queso Tronchón de 60 días de maduración.

**TABLA 2.** Valores de AAL (aminoácidos libres) y AGL (ácidos grasos libres) (valores medios y desviación estándar) de los quesos elaborados con leche sin antibiótico y con oxitetraciclina

| Parámetro                    | Oxitetraciclina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |                          |                          |                          | ANOVA   |         |
|------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|---------|
|                              | 0   | 50                       | 100                      | 200                      | F ratio | P valor |
| <b>Fisicoquímicos</b>        |   |                          |                          |                          |         |         |
| AAL<br>(mg leucina/g queso)  | 3,01(0,49)                                  | 2,93 (0,53)              | 2,72(0,43)               | 2,80(0,38)               | 1,41    | n.s.    |
| ÁGL<br>(meq KOH/100 g grasa) | 4,02 <sup>d</sup> (0,48)                    | 3,70 <sup>c</sup> (0,68) | 3,31 <sup>b</sup> (0,54) | 3,09 <sup>a</sup> (0,44) | 3,38    | 0,0386  |

Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar, <sup>a, b, c, d</sup> las medidas con letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). AAL: Aminoácidos libres, AGL: Ácidos grasos libres.

## LIPÓLISIS

El grado de lipólisis, fenómeno que también ocurre durante la maduración de los quesos, se puede evaluar mediante el contenido de ácidos grasos libres (AGL). En la tabla 2 se muestran los valores medios y desviación estándar de AAL expresados como meq KOH/100 g grasa y el resultado del ANOVA. Los resultados indican que los valores pertenecientes a los quesos control son significativamente mayores a los valores de los quesos con antibiótico, el índice de lipólisis disminuye significativamente a medida que aumenta la concentración de oxitetraciclina en las muestras. Calabuig (2015) obtuvo valores a los 60 días de maduración para los quesos control de 3,8 meq KOH/100g y para los quesos con quinolonas 3,7 meq KOH/100 g grasa y a diferencia del presente estudio, este autor no encontró diferencias significativas

entre los grupos. También Rivera et al. (2016) obtuvieron valores similares a los de este estudio en el índice de lipólisis: 3,7 (0,6) meq KOH/100 g.

## COLOR

Para evaluar el efecto de la oxitetraciclina sobre la valoración objetiva del color, en la tabla 3 se detallan los resultados ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C, h) de los quesos fabricados con leche sin antibiótico y con leche fortificada junto a los resultados del ANOVA para el factor concentración.

Según lo observado en la citada tabla, el ANOVA presenta diferencias significativas para los parámetros de luminosidad  $L^*$ , la coordenada  $a^*$  y la magnitud tono (h). Sin embargo, los valores obtenidos para los distintos quesos resultaron ser similares para estos parámetros y las diferencias no se pudieron apreciar a simple vista.

La luminosidad ( $L^*$ ) es significativamente mayor para los quesos control que para los quesos con antibiótico. Otros autores presentan resultados similares a los del presente estudio, así Buffa et al., (2001), en un estudio realizado sobre quesos curados de cabra, señalaron valores de  $L^*$ : 91,56 (0,21) a los 60 días de maduración.

La coordenada  $a^*$  presenta valores negativos en todas las muestras, lo que indica que los quesos se mueven por la zona del espacio correspondiente al color verde. Los valores para los quesos control y 0,5 LMR resultan ser significativamente menores que aquellos fabricados con leche de cabra al LMR y 2 LMR. Algunos autores encontraron en este mismo tipo de queso, valores similares a los de este estudio para esta coordenada; Quintanilla et al., (2016) obtuvo valores de -2,02 (0,32), mientras que Salvador et al. (2014) hallaron valores, a los 60 días de maduración, de -1,75 (1,0).

La coordenada  $b^*$  no presenta diferencias significativas entre los distintos grupos de quesos analizados. Se observan tonos ligeramente más amarillentos para los quesos control y LMR. En diferentes estudios se hallaron valores similares para este parámetro, Quintanilla et al., (2016) indicaron valores de  $b^*$  de 12,3 (1,5) para el queso Tronchón. Mientras que, Fresno y Álvarez, (2012) mostraron valores de  $b^*$  de 11,89 (1,22).

A partir de las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  se han calculado las coordenadas psicométricas, croma ( $C^*$ ) y tono ( $h^*$ ). Para el parámetro  $C^*$  no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos de quesos analizados. Mientras que el valor de  $h^*$  presenta diferencias significativas aumentando progresivamente con el incremento de la cantidad de antibiótico. Quintanilla et al., (2016) calcularon coordenadas similares para el queso de Tronchón: C: 12,9 (1,5) y h: 99,8 (1,8) al igual que Fresno y Álvarez, (2012): C: 12,13 (1,11) y h: 101,13 (3,67) en el queso Majorero también de leche de cabra.

**TABLA 3.** Valores de Color y Textura (medias y desviación estándar) de los quesos elaborados con leche sin antibiótico (0 µg/kg) y con oxitetraciclina y madurados 60 días.

| Parámetros         | Oxitetraciclina (µg/kg)    |                           |                           |                           | ANOVA   |         |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|---------|
|                    | 0                          | 50                        | 100                       | 200                       | F-ratio | P-valor |
| <b>Color</b>       |                            |                           |                           |                           |         |         |
| L*                 | 88,89 <sup>c</sup> (3,06)  | 87,32 <sup>b</sup> (3,35) | 84,51 <sup>a</sup> (3,88) | 85,33 <sup>a</sup> (2,70) | 12,87   | 0,0000  |
| a*                 | -1,71 <sup>a</sup> (0,25)  | -1,68 <sup>a</sup> (0,28) | -1,87 <sup>b</sup> (0,19) | -1,97 <sup>b</sup> (0,25) | 10,58   | 0,0000  |
| b*                 | 11,91 <sup>a</sup> (1,21)  | 11,74 <sup>a</sup> (1,27) | 12,17 <sup>a</sup> (1,25) | 11,66 <sup>a</sup> (1,07) | 1,25    | n.s.    |
| C                  | 12,04 (1,23)               | 11,86 (1,27)              | 12,32 (1,23)              | 11,83 (1,08)              | 1,25    | n.s.    |
| H                  | 98,79 <sup>ab</sup> (0,62) | 98,40 <sup>a</sup> (1,06) | 98,99 <sup>b</sup> (1,60) | 99,63 <sup>c</sup> (1,02) | 7,21    | 0,0002  |
| <b>Textura</b>     |                            |                           |                           |                           |         |         |
| Dureza (N)         | 29,63 (5,69)               | 26,38 (6,24)              | 28,87(9,58)               | 26,05(8,02)               | 2,01    | n.s.    |
| Adhesividad (N*s)  | -1,84(0,52)                | -1,57(0,62)               | -1,17(0,63)               | -1,26(0,57)               | 9,81    | n.s.    |
| Elasticidad        | 0,54(0,01)                 | 0,51(0,14)                | 0,49(0,09)                | 0,46(0,07)                | 3,93    | n.s.    |
| Cohesividad        | 0,23 (0,03)                | 0,26(0,05)                | 0,26(0,08)                | 0,29(0,03)                | 8,35    | n.s.    |
| Masticabilidad (N) | 3,80(1,17)                 | 3,39(1,25)                | 3,43(1,02)                | 3,24(1,09)                | 1,52    | n.s.    |

Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar <sup>a, b, c, d</sup> las medidas con letras diferentes en la misma fila difieren significativamente (P < 0,05). n. s.: No existen diferencias significativas.

## TEXTURA

En la tabla 3 se presentan los resultados de los parámetros de textura (dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad y masticabilidad). Según el ANOVA ninguno de los parámetros analizados presenta diferencias significativas. La dureza resulta ligeramente mayor para los quesos control frente a los quesos con residuos de antibiótico. El mismo comportamiento se observa para el parámetro de masticabilidad.

La adhesividad es levemente mayor para los quesos del grupo control y 0,5 LMR que para LMR y 2 LMR. Valores similares fueron hallados por Quintanilla et al., (2016): - 1,96 (1,30).

Los valores de elasticidad, coinciden con los hallados por Delgado et al., (2011): 0,67 (0,01) y Quintanilla et al. (2016): 0,47 (0,04).

El parámetro de cohesividad, que se relaciona con la fuerza de los enlaces internos del queso, resulta ser menor, aunque no significativo, para los quesos control respecto a los quesos con residuos de antibiótico. Esto se podría relacionar con los resultados de lipólisis obtenidos para los quesos control, los cuales fueron mayores que para los quesos con oxitetraciclina, evidenciando una menor fuerza de los enlaces internos debido al proceso de maduración. Valores similares fueron hallados por Quintanilla et al. (2016): 0,24 (0,04).

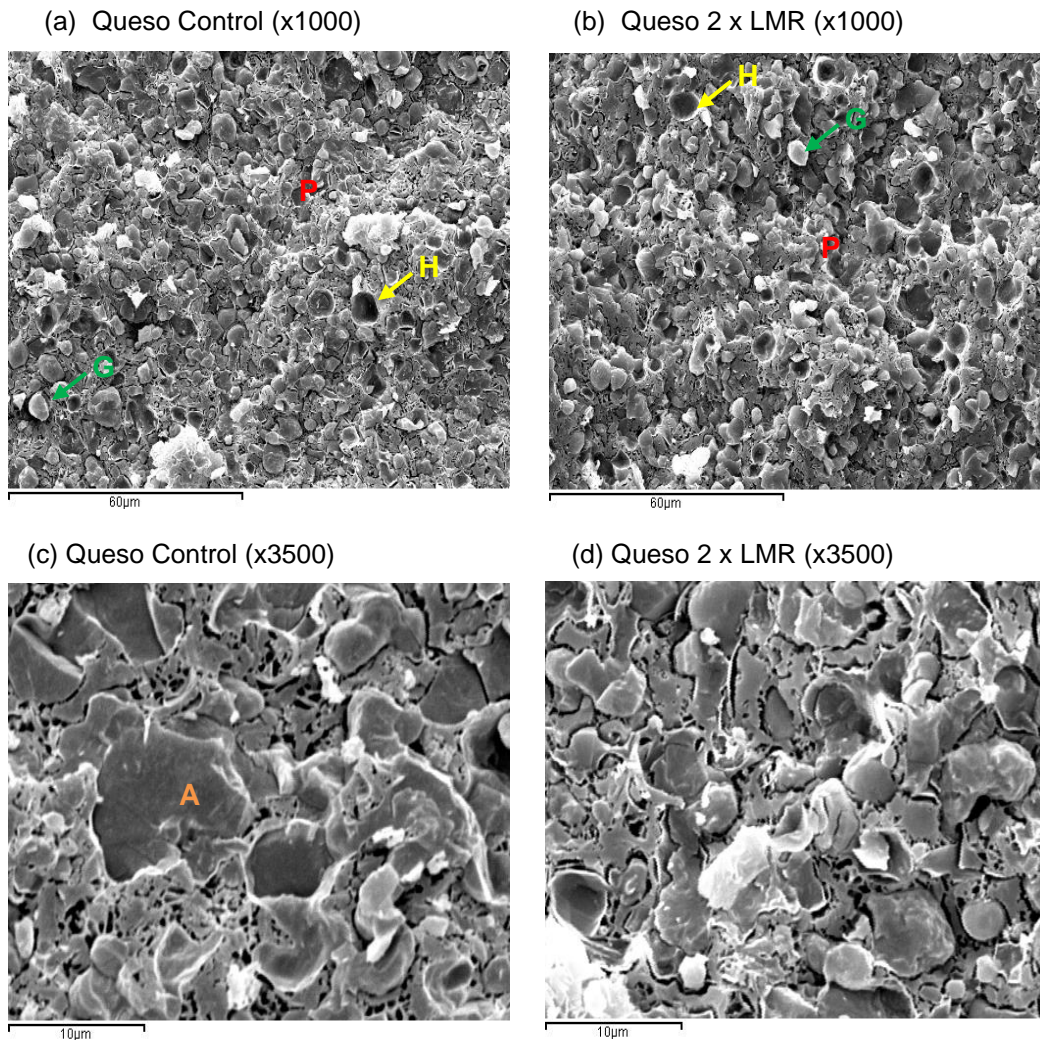
Hay que tener en cuenta que las propiedades reológicas están influenciadas por muchos factores, incluyendo la variedad de queso, el proceso de elaboración, el método de análisis seleccionado y los parámetros analizados (Van Hekken, 2004).

### **Microscopía Electrónica de Barrido**

Esta técnica se ha utilizado para estudiar la microestructura de los quesos control y 2 LMR (200 µg/kg) debido a que es una herramienta útil para proporcionar información sobre los productos lácteos, que ayuda a comprender los factores que afectan las propiedades funcionales, sensoriales y físicas (Hassan y Awad 2005).

### **MICROESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJA TEMPERATURA (Cryo-SEM)**

En la figura 3 se presentan las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura (Cryo-SEM) a distintos aumentos. En las imágenes (a) y (b) se puede visualizar una red tridimensional continua constituida por proteínas (P), deja en su estructura huecos redondeados (H), que originalmente pudieron estar ocupados por grasa (Hernando et al., 2000). Además se observa la grasa organizada en forma de glóbulos (G). No se aprecian diferencias entre la muestra control y la 2 LMR. Sin embargo, al observar la microestructura a mayores aumentos (c) y (d) se puede visualizar, en el caso del queso control, zonas donde la grasa se encuentra agregada (A) y presenta un aspecto amorfo, mientras que en el queso 2 LMR la estructura se aprecia más ordenada y no se observa tanta coalescencia de los glóbulos de grasa. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos para el índice de lipólisis de los quesos, donde para el queso control el índice era significativamente mayor que para el queso 2 LMR.



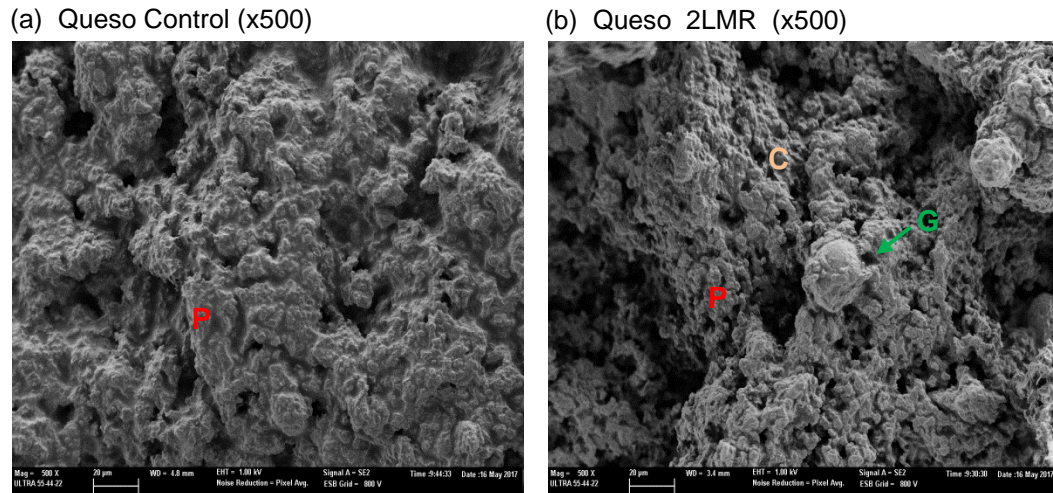
**FIGURA 3.** Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura (Cryo-SEM). Imagen (a), queso Tronchón control (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), y (b) queso Tronchón 2 LMR (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Barra 60 $\mu\text{m}$ . Imagen (c) queso Tronchón control (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y (d) queso Tronchón 2 LMR (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Barra 10  $\mu\text{m}$ . P: Matriz proteica, A: Grasa agregada, G: Glóbulo de grasa, H: Huecos.

### MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por Cryo-SEM, se realizó el análisis de las muestras control y 2 LMR por FESEM. Esta técnica se emplea como una poderosa herramienta para entender las relaciones entre las propiedades texturales y los análisis físico-químicos, por ejemplo, observando el estado de la grasa (Everett et. al. 2008). En la figura 4 se presentan las



imágenes obtenidas, donde es posible observar la matriz proteica (P), la caseína (C) y algunos glóbulos de grasa (G).



**FIGURA 4.** Microscopía Electrónica de emisión de campo (FESEM). Imagen (a) del queso Tronchón control (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y (b) queso Tronchón 2 LMR (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Barra 20  $\mu\text{m}$ . (P): Matriz proteica, (C): Caseína, (G): glóbulo de grasa.

Analizando visualmente las imágenes, podemos observar en ambas la red de proteínas, principalmente caseínas, que forman la matriz proteica. En la imagen (a), perteneciente al queso control, se observa como la grasa se encuentra recubriendo la matriz proteica y no se pueden apreciar con claridad los glóbulos de grasa. Por otro lado, en la imagen (b) perteneciente al queso 2 LMR se puede visualizar la matriz proteica y zonas donde la grasa se organiza en forma de glóbulos individualizados. Na Zhang & Xin-Huai Zhao (2010) en un estudio de *Mucor spp* en la maduración de quesos semiduros de cabra, han obtenido imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) a los 60 días de maduración del queso, similares a las obtenidas para el queso control analizado por FESEM figura 4 (a) del presente estudio. Se puede observar como la grasa se encuentra recubriendo la matriz proteica al igual que sucede con el queso control luego de 60 días de maduración.

### Análisis sensorial

Para evaluar la influencia de la presencia de oxitetraciclina en el agrado de las características sensoriales de los quesos madurados, se realizaron escalas hedónicas con catadores entrenados, considerando diferentes atributos (olor, color, apariencia y textura), así como el agrado general.

En la Tabla 4 se muestran los valores medios y la desviación estándar de las puntuaciones obtenidas.

**TABLA 4.** Valoraciones de los jueces resultantes de las pruebas escales para los atributos de olor, color, apariencia y textura, así como para el agrado general de los quesos elaborados con leche sin antibiótico y con oxitetraciclina

| Parámetro        | Oxitetraciclina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |             |             |             | ANOVA   |         |
|------------------|---|-------------|-------------|-------------|---------|---------|
|                  | 0   | 50          | 100         | 200         | F ratio | P valor |
| <b>Sensorial</b> |   |             |             |             |         |         |
| Olor             | 5,99 (2,03)                                 | 6,25 (1,83) | 6,59 (1,63) | 6,55 (1,78) | 1,13    | n.s.    |
| Color            | 6,99 (1,34)                                 | 7,17 (1,36) | 6,94 (1,38) | 7,10 (1,21) | 0,29    | n.s.    |
| Apariencia       | 6,99 (1,28)                                 | 7,00 (1,43) | 6,95 (1,43) | 7,19 (1,24) | 0,31    | n.s.    |
| Textura          | 7,13 (1,26)                                 | 7,14 (1,26) | 6,98 (1,56) | 7,15 (1,40) | 0,16    | n.s.    |
| Agrado general   | 6,80 (1,38)                                 | 6,78 (1,47) | 6,87 (1,39) | 6,97 (1,45) | 0,18    | n.s.    |

Los valores entre paréntesis son la desviación estándar, <sup>a, b, c, d</sup> las medidas con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) n.s.: No significativo.

Los resultados mostraron que la presencia de residuos de oxitetraciclina no influye sobre los atributos sensoriales analizados, ya que los catadores no aprecian diferencias significativas entre los quesos control y los quesos que contenían diferentes concentraciones de este antibiótico. El análisis organoléptico ratifica que, tal y como se ha observado para los parámetros de textura evaluados, la presencia de esta sustancia no influye sobre estos parámetros en los quesos de Tronchón de 60 días de maduración.

### Cuantificación de residuos de oxitetraciclina en los quesos

Con la finalidad de conocer la concentración de antibiótico residual en los quesos, al finalizar el periodo de maduración, se ha realizado la cuantificación mediante HPLC. Los resultados obtenidos (concentración media y desviación estándar) fueron para los quesos 0,5 LMR: 6,60 (1,22)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , LMR: 20,03 (5,66)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y para 2 LMR: 78,97 (16,98)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Esto indica que, después de un periodo de maduración de 60 días la concentración residual de antibiótico en todos los quesos es menor que al Límite Máximo de Residuos (LMR) permitido para la leche (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), lo que podría indicar que no representaría un riesgo para el consumidor.

### CONCLUSIONES

La presencia de antibiótico retrasó significativamente la acidificación de la cuajada en la etapa de prensado; hecho que podría generar un problema para la industria láctea por la consiguiente demora en el proceso de elaboración del queso. Sin embargo la presencia de residuos de oxitetraciclina en leche, a diferentes concentraciones (0.5 LMR, LMR y 2 LMR), no afectó de forma general a la composición del queso Tronchón ni a los parámetros fisicoquímicos, color, reológicos y sensoriales del mismo.

En el queso curado con residuos de antibiótico, el grado de lipólisis (contenido de ácidos grasos libres) fue significativamente menor al observado en el queso control, mientras que el índice de proteólisis no se modificó. Las imágenes de microscopía han ratificado una mayor lipólisis en los quesos sin antibiótico ya que en ellos la grasa se encontraba agregada y recubriendo la matriz proteica, mientras que en los quesos con mayor contenido de oxitetraciclina la grasa se organizaba en glóbulos grasos.

Las concentraciones residuales de oxitetraciclina halladas en los quesos curados fueron inferiores al límite máximo permitido para este antibiótico en la leche, por lo tanto, en principio su presencia no representarían un riesgo para el consumidor.

Dada la problemática de la presencia de antibióticos para la seguridad alimentaria y la industria láctea, resulta de interés continuar estudiando el efecto de la presencia de otras familias de antibióticos en la leche destinada a su posterior transformación en queso.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto “Trazabilidad de la presencia de antibióticos en la leche, queso y lactosuero de cabra” AGL2013-45147-R, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

## REFERENCIAS

- Adetunji, V.O. 2011. Effects of processing on antibiotic residues (Streptomycin, Penicillin-G and Tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. *Pakistan Journal of Nutrition*, **10**: 792-795.
- Berruga, M.; Román, M.; Molina, M.; Molina, A. 2005. Detection of antibiotic residues on cheese whey. *Congresso Internazionale della Fe.Me.S.P.Rum Bari, Italia*.
- Berruga, M. I.; Battacone, G.; Molina, M. P.; Roman, M.; Molina, A. 2007. “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.; 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.
- Berruga, M.; I., Molina, A.; Althaus, R. L.; Molina, M. P. (2016). Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. *Small Ruminant Research*, **142**, 38 e 43.
- Bueno, F. J. 2009. Historia, tradición y salud. En: *Los quesos de la Comunidad Valenciana*. Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Valencia.19-34.
- Buffa, M. N.; Trujillo, A. J.; Pavia, M.; Guamis, B. 2001. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *International Dairy Journal*, **11**: 927-934.
- Bradley, A.; Green, M. (2009). “Factor's affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin based intramammary preparations”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 8845-8850.

- Cabizza, R.; Rubattu, N.; Salis, S.; Pes, M.; Comunian, R.; Paba, A.; Urgeghe, P. P. 2016. Transfer of oxytetracycline from ovine spiked milk to whey and cheese. *International Dairy Journal*, **70**: 12-17.
- 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.
- Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, cations, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**: 232-260.
- 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 highpressure at different stages of maturation. *LWT-Food Sci. Tech.*, **48**: 268-275.
- Everett, D. W.; Auty, M.A.E. 2008. Cheese structure and current methods of analysis *International Dairy Journal*, **18**:759 - 773.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014, doi:10.2903/j.efsa.2016.4380www.
- FAOSTAT. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division. Rome: FAO. <<http://faostat3.fao.org/>>. [Consulta: junio de 2017].
- Franco, I.; Prieto, B.; Bernardo, A.; Prieto, G. J.; Carballo, J. 2003. Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, **13**: 221-230.
- Fresno, J. M.; Tomadizo, M. E.; Carballo, J.; González, P.; Bernardo, A. 1996. Characterization and biochemical changes during the ripening of Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, Vol. 55, No. 3, pp. 225-230.
- Fresno, M. & Álvarez, S. 2012. Chemical, textural and sensorial changes during the ripening of Majorero goat cheese. *International Dairy Journal*, **65**: 393-400.
- Folkertsma, B.; Fox, P. F. 1992. Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, **59(02)**: 217-224.
- Giraldo, J.; Althaus, R. L.; Beltrán, M. C.; Molina, M. P. 2017. Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk. *International Dairy Journal*, **69**: 40-44.
- Khaniki, G. R., 2007. Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concerns: A Review. *International Journal of Dairy Science*, **2**: 104-115.
- Hassan, A.N.; Awad, S. 2005. Application of Exopolysaccharide-Producing Cultures in Reduced-Fat Cheddar Cheese: Cryo-Scanning Electron Microscopy Observations. *J. Dairy Sci.* **88**: 4214 - 4220.
- Hernando I.; Pérez-Munuera, I.; Lluch, M.A. 2000. Microstructural characterization of Burgos cheese using different microscopy techniques. *Food Science and Technology International*. **6 (2)**: 151-157.
- MAPAMA (2017). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. <[www.mapama.gob.es](http://www.mapama.gob.es)>, [Consulta: junio de 2017].
- MAPAMA (2017). Catalogo electrónico de quesos de España. <<http://www.alimentacion.gob.es>>, [Consulta: mayo 2017].
- Martínez, S.; Franco, I.; Carballo, J. 2011. Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research* **101**: 41– 54.
- Miguel, E.; Onega, E; Bázques.; B.; Ruiz De Huidobro, F. 2002. "Composición química, recuento microbiológico y características sensoriales de los quesos elaborados con leche de la raza autóctona cabra del Guadarrama". 335-340. XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia.
- Na Zhang, Na.; Zhao Xin-Huai. 2010. Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. *J Food Sci Technol* **47(6)**: 613–619.

- Núñez, M.; Garcia - Aser, C.; Rodriguez-Martin, M. A.; Medina, M.; Gaya, P. 1986. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. *Food chemistry*, **21(2)**: 115-123.
- Olarte, M. C. 2010. "Caracterización del queso de Cameros: Evolución de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos durante su maduración". Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra.
- Oliver, S. P.; Murinda, S. E.; Jarayao, B. M. 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: A comprehensive review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, 337 e 355.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2017. Dirección URL: <http://www.who.int/es/> [Consulta Julio 2017].
- Packham, W.; Broome, M. C.; Limsowtin, G. K. Y.; Roginski, H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*, **56**: 15–18.
- Park, Y.W. 2001. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *International Dairy Journal*. 84 (E. Suppl.): E84 -E92.
- Quintanilla, P.; Rivera, N.; Beltrán, M. C.; Escriche, I.; Molina, M. P. 2016. "Caracterización del queso de 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.
- REAL DECRETO 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. Boletín Oficial de Estado, Boletín Oficial del Estado, núm.239 del 6 de octubre de 2006, 34717-34720.
- 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.; Molina M.P. 2016. Caracterización del queso de Tronchón elaborado con leche cruda de cabra. Parte 1: 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.
- Salvador, A.; Igual, M.; Contreras, C.; Martínez-Navarrete, N.; Del Mar Camacho, M. 2014. Effect of the inclusion of citrus pulp in the diet of goats on cheeses characteristics. *Small Ruminant Research*, **121**: 361-367.
- Zorraquino, M.; Althaus, R.; Roca, M.; Molina, M. (2011). "Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk". *Journal of Food Protection*, **74**: 311-315.