

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



RECOPIACION DE METODOS DE ANALISIS OFICIALES Y NO OFICIALES
MAS EMPLEADOS PARA DETERMINAR FOSFATASA ALCALINA Y
LACTOPEROXIDASA EN LECHE Y QUESOS.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
SONIA ELENA CRISTALES GEORGE

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 2009

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS

Ing. Rina Lavinia Hidalgo de Medrano.

**ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL, TOXICOLOGIA Y
QUIMICA LEGAL**

Lic. María Luisa Ortíz de López

DOCENTE DIRECTORA

Lic. Dinorah del Carmen Rodríguez de Láinez

AGRADECIMIENTOS

A **Lic. Dinorah de Laínez**, mi asesora directora de trabajo de tesis quien tuvo el interés de embarcarse juntamente conmigo en este proyecto de tesis y que dispuso su tiempo y esfuerzo en el, por su orientación, oraciones y motivación a seguir adelante confiando en Dios. Reciba bendiciones del Altísimo en su vida en su familia y en su carrera. Muchas gracias.

A **Ing. Lavinia de Medrano y Lic. María Luisa de López** docentes asesoras de área quienes sin sus observaciones y revisiones de este trabajo no podrían haberse llevado a fin. Agradezco su colaboración, su interés, esfuerzo y su valioso tiempo. Que Dios les conceda muchas bendiciones en sus vidas y las peticiones de su corazón.

A **Lic. Odette Rauda** Coordinadora de Trabajos de Graduación de la Facultad de Química y Farmacia, quien también me impulsó a seguir adelante, por sus consejos y me inyectó animo para no rendirme en el proceso y culminar la carrera, por todo su tiempo y esfuerzo. Que Dios la colme con su bendición a usted y a su familia.

A todos los laboratorios de análisis que amablemente me brindaron la información que permitió la conformación de este trabajo.

A todas las autoridades y en especial a los docentes de la Facultad de Química y Farmacia que brindaron sus conocimientos y experiencia para mi formación académica y profesional, gracias por su entrega todos estos años, por sembrar parte de sus vidas en las nuevas generaciones dentro de las aulas de nuestra amada facultad y por seguirlo haciendo aún. ¡Que Dios los Bendiga y les muestre que Él es El Dios que esta enamorado de ustedes!

DEDICATORIA

La honra sea para Él, que me dio un motivo de existir. Él que infundió vida a mi alma cuando más lo necesite; cuando entre la gente camine pero sola y perdida me sentí. A quien por todo y en todo de mi vida deseo que sea glorificado y que sus propósitos para mi vida se cumplan en todo tiempo: **A mi papi Dios, a su Santo Espíritu y a mi Amado Cristo ofrezco el presente triunfo.**

También debo reconocer el profundo amor y apoyo de una mujer valiente, calida y decidida: **Zonia Mirian George**; que desde mi nacimiento hasta el día de hoy se ha sacrificado por mí, la que día a día se enfrento conmigo al desanimo, a la ansiedad y al desaliento empujándome a seguir adelante hasta alcanzar la meta, teniendo paciencia y comprendiéndome muy bien, la que nunca dejo de elevar su agradable oración delante de Dios por mi vida. Ella a quien Dios escogió para que fuera la que trajera en su vientre a este mundo mi persona: **Infinitas Gracias Mamita Te Amo.**

Sin duda mí amada abuelita: **Maria Luisa George**, a quien debo agradecer me halla cuidado durante mi infancia; quien también me ha apoyado constantemente en oración y ruegos por mi vida durante este largo proceso. **Que Dios te cuide siempre Abueli.**

A toda mi amada familia, a mis amigos y hermanos amados en Cristo quienes también han sido de fortaleza para mí en este camino: Muchísimas Gracias.

A ti que tienes la bondad de abrir este trabajo quiero decirte: Nunca te Rindas y No Tengas Miedo a nada, si amas a Dios y le buscas le encontrarás y El estará contigo para siempre. Prepárate Jesucristo Regresa Pronto. Búscales mientras puedas hallarlo. Isaías 55:6 y 7.

Con el corazón, Sonia George.

INDICE

Resumen	
Capítulo	
I. Introducción	xxi
II. Objetivos	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivo Especifico	
III. Marco Teórico	25
3.1 Marco contextual	26
3.2 Leche	27
3.3 Leche cruda	29
3.4 Leche pasteurizada	30
3.4.1 Procesamiento de la Leche	30
3.5 Queso	34
3.6 Queso maduro	37
3.7 Queso fresco	39
3.8 Fabricación general del queso	40
3.9 Pasteurización	43
3.9.1 Tipos de pasteurización y esterilización	

3.9.1.1	Pasteurización discontinua o pasteurización Baja (pasteurización lenta).	46
3.9.1.2	Pasteurización alta o (HTST) Alta Temperatura en Corto Tiempo (pasteurización rápida).	48
3.9.1.3	Sistema Ultra-Temperaturas o Ultra Pasteurización (UHT).	50
3.9.2	Ventajas en la pasteurización de leche destinada a quesería.	51
3.9.3	Desventajas en la pasteurización de leche destinada a quesería	52
3.10	Enfermedades causadas por ingesta de productos lácteos no pasteurizados.	53
3.11	Fosfatasa Alcalina	
3.11.1	Generalidades	56
3.11.2	Características de la Fosfatasa alcalina	61
3.11.3	Mecanismos de reactivación de la Fosfatasa alcalina.	62
3.11.4	Actividad in vivo de la enzima Fosfatasa alcalina	65
3.12	Lactoperoxidasa	
3.12.1	Generalidades	66
3.12.2	Características de la Lactoperoxidasa	68
3.12.3	Mecanismos de Inactivación de la Lactoperoxidasa	70
3.12.4	Actividad in vivo de la enzima Lactoperoxidasa	71
3.13	Espectroscopia visible	72

3.14 Fundamentos de los métodos investigados.	
3.14.1 Fundamentos de los Métodos para Fosfatasa alcalina	74
3.14.1.1 Método de Scharer	74
3.14.1.2 Método de Cornell	74
3.14.1.3 Método de Sanders y Sager	75
3.14.1.4 Método de Rutgers	75
3.14.1.5 Método de Aschaffenburg y Mullen	77
3.14.1.6 Prueba para Fosfatasa con 4-Aminoantipirina	77
3.14.1.7 Método Fluorimétrico	78
3.14.1.8 Método para Fosfatasa alcalina reactivada	79
3.14.2 Fundamento de los Métodos para determinar	
Lactoperoxidasa	80
3.14.2.1 Reacción de Dupoy	80
3.14. 2.2 Método de Storch	81
3.14. 2.3 Método de Rothenfusser	81
3.14. 2.4 Método ABTS [Acido 2,2'-Azino-bis].	
(3-etil- benzotiazolin) 6 - sulfónico]	81
3.14.2.5 Reacción de Trinder	83
3.15 Procedimiento de los métodos de análisis para determinar	
Fosfatasa alcalina y Lactoperoxidasa en lácteos.	85
3.15.1 Métodos más conocidos para determinar	
Fosfatasa alcalina.	85

3.15.1.1 Prueba rápida para Fosfatasa por Método de Scharer.	85
3.15.1.2 Método Espectrofotométrico modificado para Fosfatasa	93
3.15.1.3 Método de Cornell para Fosfatasa	99
3.15.1.4 Método de Rutgers para Fosfatasa	105
3.15.1.5 Método de Aschaffenburg y Mullen	109
3.15.1.6 Método de Sanders y Sager Modificado	112
3.15.1.7 Prueba con 4-aminoantipirina para determinar Fosfatasa alcalina	120
3.15.1.8 Método Fluorimétrico para Fosfatasa Alcalina	123
3.15.1.9 Método para determinar Fosfatasa alcalina reactivada por tratamientos (HTST) y (UHT)	136
3.15.2 Determinación de Lactoperoxidasa	140
3.15.2.1 Reacción de Dupoy	140
3.15.2.2 Método de Storch	142
3.15.2.3 Método de Rothenfusser	144
3.15.2.4 Método ABTS [Acido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin) 6-sulfónico]	146
IV. Diseño Metodológico	149
V. Resultados	166
VI. Discusión de Resultados	170

VII. Conclusiones	176
VIII. Recomendaciones	179
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

Indice de Cuadros

CUADRO Nº

1. Sistemas de Calentamiento.	Pág. 52
2. Preparación de Estándares de fenol para el método de Scharer.	Pág. 90
3. Adición de Reactivos en el método de Scharer.	Pág. 92
4. Estándares de fenol para el método de Cornell.	Pág. 102
5. Adición de Reactivos en el Método de Cornell.	Pág. 104
6. Adición de Reactivos en el Método de Rutgers.	Pág. 107
7. Adición de Reactivos en el Método de Aschaffenburg y Mullen.	Pág. 111
8. Adición de Reactivos en el Método de Sanders y Sager.	Pág. 117
9. Preparación de Estándares de fenol para Curva patrón del método de Sanders y Sager.	Pág. 118
10. Adición de Reactivos en el Método de 4-aminoantipirina para Fosfatasa alcalina.	Pág. 122
11. Adición de Reactivos en el tratamiento para determinar Fosfatasa reactivada.	Pág. 138
12. Adición de Reactivos en la Prueba de Dupoy.	Pág. 141
13. Adición de Reactivos en la Prueba de Storch.	Pág. 143
14. Adición de Reactivos en el método de Rothenfusser.	Pág. 145

15. Preparación de Reactivo ABTS /Muestra en el método

ABTS.

Pág. 147

16. Adición de Reactivos en el método ABTS.

Pág. 147

Índice de Figuras

FIGURA Nº

1. Subunidad polipeptídica de la enzima fosfatasa alcalina. Pág. 57
2. Molécula de Fosfatasa Alcalina totalmente funcional. Pág. 57
3. Reacción de hidrólisis producida por la enzima Fosfatasa Alcalina sobre los esteres fosfóricos. Pág. 66
4. Subunidad de una molécula de peroxidasa. Pág. 67
5. Reacción de Scharer para Fosfatasa alcalina. Pág. 74
6. Reacción de Sanders y Sager para Fosfatasa alcalina. Pág. 75
7. Reacción de Rutgers para Fosfatasa alcalina. Pág. 76
8. Reacción de Aschaffenburg y Mullen. Pág. 77
9. Reacción de Fosfatasa alcalina con 4-aminoantipirina. Pág.78
10. Reacción de Método Fluorimétrico para determinar Fosfatasa alcalina. Pág. 78
11. Reacción de Dupoy para Lactoperoxidasa. Pág. 80
12. Reacción de Storch para Lactoperoxidasa. Pág. 81
13. Reacción ABTS para Lactoperoxidasa Pág. 83
14. Reacción de Trinder para Lactoperoxidasa. Pág. 84

Indice de Anexos

ANEXO N°

1. Cuidados y precauciones para realizar las metodologías de análisis de fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa.
2. Información que debe acompañar a las muestras y controles.
3. Precauciones y cuidados a tomar para realizar análisis de fosfatasa alcalina para evitar resultados falsos positivos en los ensayos.
4. Controles aplicables a todos los procedimientos para fosfatasa alcalina.
5. Esquema del Método Rápido de Scharer
6. Esquema del Método de Scharer Modificado
7. Esquema del Método de Cornell
8. Esquema del Método de Rutgers
9. Esquema del Método de Aschaffenburg Y Mullen
10. Esquema del Método de Sanders Y Sager Modificado
11. Esquema de la Prueba con 4- Aminoantipirina
12. Esquema del Método para Determinar Fosfatasa Alcalina Reactivada.
13. Esquema de Reacción de Dupoy
14. Esquema de Método de Storch
15. Esquema de Método de Rothenfusser
16. Esquema de Método de ABTS

17. Método por Reacción de Trinder

-Determinación Enzimática de Glucosa y Sacarosa en Alimentos.

(Reacción de Trinder)

-Determinación de Glucosa (Método Glucosa - Oxidasa) en Fluidos

Biológicos. (Reacción de Trinder)

18. Toxicidad de Sustancias Químicas Peligrosas Empleadas en los Análisis

y Hojas de datos de seguridad.

ABREVIATURAS

ABTS: [Acido 2,2'-Azino (3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico].

ACGIH: (American Conference of Governmental Industrial Hygienists)
Conferencia Americana Gubernamental de Higiene Industrial.

ALP: Actividad de la Lactoperoxidasa.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists): Asociación de Químicos Analíticos Oficiales.

BQC: 2,6 dibromoquinona clorimida.

CAS: (Chemical Abstracts Service) el número asignado por el Servicio de Químicos Abstractos para identificar a una sustancia química específica.

CONACYT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

CQC: 2, 6 dicloroquinona clorimida.

DEP: (New Jersey Department of Environmental Protection). Departamento de Protección Ambiental del Estado de New Jersey.

DOT (Department of Transportation): Departamento de Transporte que regula el transporte de químicos.

EPA: (Environmental Protection Agency). Agencia de Protección Ambiental.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FDA (Food and Drug Administration): Administración de Drogas y Alimentos.

FLU: Unidades de Fluorescencia.

HHAG (Human Health Assessment Group de la EPA): Grupo Evaluador de Salud Humana.

HTST (High Temperatura Short Time): Tiempo Corto Alta Temperatura.

IPOA: Inspección de Productos de Origen Animal.

IRIS (Integrated Risk Information System): Sistema Integrado de Información de Riesgos, base de datos de la EPA.

LP: Lactoperoxidasa.

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

MSPAS: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

NFPA: (National Fire Protection Association). Asociación Nacional para la Protección contra Incendios.

NIOSH: (National Institute for Occupational Safety and Health). Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional.

NSO: Norma Obligatoria Salvadoreña.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

UHT (Ultra High Temperatura): Temperatura Ultra Alta.

RESUMEN

El presente trabajo es una recopilación bibliográfica, de metodologías para el análisis cuantitativo y cualitativo en la determinación de las enzimas Fosfatasa alcalina residual, reactivada y Lactoperoxidasa, con la finalidad de que puedan ser consideradas e implementadas en las normativas del país, ya que en la actualidad solo se ha contemplado la metodología para fosfatasa alcalina en leches pasteurizadas. Y en el caso de las leches UHT únicamente se realizan análisis microbiológicos.

Así también se realizó una investigación sobre los métodos específicos de análisis que se realizan para verificar los procesamientos térmicos en las leches y quesos. Se empleó como instrumento de investigación una encuesta realizada a profesionales responsables que laboran en laboratorios gubernamentales y privados, especializados en el análisis de alimentos y de esta forma conocer si emplean métodos como el de la enzima Fosfatasa alcalina, que se aplica para pasteurizaciones normales y la enzima Lactoperoxidasa para procesos de pasteurización HTST y ultra pasteurización (UHT).

En el país, el Ministerio de Agricultura y Ganadería emplea el Método Fluorimétrico para Fosfatasa alcalina residual y los dos laboratorios privados consultados emplean el Método de Scharer. Estos métodos son útiles para verificar pasteurizaciones normales en leches, muestreadas en la planta procesadora. Sin embargo estas metodologías no son aplicables a leche en estantería o anaquel debido a que la Fosfatasa alcalina tiende a reactivarse de

acuerdo al tiempo y a la temperatura a la que se exponga. La reactivación puede darse en un par de días a una semana, según sean de extremas las condiciones a las que se haya procesado la leche.

En el país no se tiene un método específico para verificar este tipo de procesos de pasteurizaciones HTST y UHT. Por lo que se recomienda la revisión de la NSO 67.01.15:07 Productos Lácteos. Leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas con sabor. Especificaciones, para la inclusión de metodologías como la de determinación de Fosfatasa alcalina reactivada, los métodos de ABTS o el de Dupoy para Lactoperoxidasa. Los cuales resultan ser menos tóxicos que otros métodos de análisis.

También es necesario optar por el empleo de más metodologías para Fosfatasa alcalina que sean amigables con el medio ambiente y con menores riesgos a la salud, como pueden ser: El método fluorimétrico (empleado actualmente por el MAG), el método de Rutgers o el método de 4-aminoantipirina.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1. 0 INTRODUCCION

La efectividad de los tratamientos térmicos a los que se somete la leche, garantiza la salubridad y calidad del producto tanto de consumo nacional como de exportación. Sin embargo, el organismo de control gubernamental, y los laboratorios privados especializados en el control de calidad en alimentos, así como también los productores industriales de lácteos, en el país emplean en la actualidad los métodos químicos de análisis que determinan la enzima fosfatasa alcalina residual los cuales en caso de que los resultados muestren incertidumbre, no permite verificar la presencia de la enzima reactivada o si ésta es residual a un tratamiento térmico ineficaz lo cual genera sospecha en los resultados de los análisis que se realizan para determinar la efectividad del proceso de pasteurización en los lácteos.

Así también hay que mencionar que el consumo de leches procesadas a temperaturas ultra altas, es cada vez mayor pero en el país actualmente no se emplea ningún método para la verificación de la eficiencia de este proceso y el sobrecalentamiento en la leche, para lo cual es útil la enzima Lactoperoxidasa.

Es por ello que en este trabajo se presentan las metodologías más conocidas para verificar los procesos térmicos comprobando la presencia de las enzimas mencionadas, las cuales podrían ser útiles a los sectores antes citados.

Estudios internacionales muestran el empleo de la enzima Fosfatasa alcalina residual para determinar pasteurizaciones bajas en leche cruda en granjas y también se ha estudiado la actividad de Lactoperoxidasa en leche con

procesamiento HTST y UHT, a través de métodos analíticos siendo algunos de ellos más recomendados por la baja toxicidad de los reactivos que emplean.

Los estudios realizados en el país referentes de estas dos enzimas presentes en la leche son pocos, donde únicamente se registra un estudio sobre la Fosfatasa alcalina (residual) presente en quesillos de procedencia artesanal e industrial ⁽¹³⁾. Y ninguna investigación referente a Lactoperoxidasa.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Recopilar bibliográficamente métodos de análisis químico, oficiales y no oficiales para la determinación de fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa en leche y queso.

2.2 Objetivos Específicos:

- 2.2.1 Realizar una encuesta a las entidades gubernamentales y no gubernamentales competentes para conocer los métodos de verificación de la eficacia del tratamiento térmico para leche y quesos en el país.
- 2.2.2 Investigar bibliográficamente los métodos analíticos de la fosfatasa alcalina residual, reactivada y lactoperoxidasa en leches y quesos considerados oficiales y no oficiales.
- 2.2.3 Describir el fundamento de los métodos de análisis para Fosfatasa alcalina y para Lactoperoxidasa.
- 2.2.4 Desarrollar las metodologías para el análisis de fosfatasa alcalina residual, reactivada y lactoperoxidasa así como los procesos de preparación de reactivos a emplear en las pruebas analíticas respectivas.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONTEXTUAL

En 1960, se decretó por la Asamblea Legislativa, la ley de producción higiénica de la leche, otros productos lácteos y la regulación de su expendio. (d L. N.31443-10-1960), y su respectivo reglamento en 1971. (d. E. N. 4830-09-1971).

El Código de Salud en el Art. 89: Establece como obligatoria la pasteurización, esterilización u otro tratamiento de la leche en los lugares de procesamiento industrial, artesanal o cualquier otro establecimiento que se dedique a tales actividades.

Señalando una reforma del Código de Salud, que para el cumplimiento de esa obligatoriedad, se establece un plazo prudencial, progresivo y paulatino.

Con todo ello la poca o ninguna tecnificación con la que la mayoría de productores de leche se encuentra en el país, contribuye a que los productos lácteos, en su mayoría artesanales, tengan los mínimos niveles estándar de calidad y salubridad.

Aunque el código de salud en su art.89 no exige a los productores artesanales, la pasteurización de la leche, sí estos procesan hasta 2000 botellas (1500 litros); sin embargo, es este sector artesanal donde el mayor porcentaje de leche es procesado según el Ministerio de Agricultura y Ganadería, en condiciones no adecuadas, resultando en productos lácteos que constituyen un riesgo a la salud del consumidor.

El sector industrializado aunque realiza esfuerzos por tecnificarse y cumplir con las normas de calidad, no está operando en su total capacidad de producción, esto debido a los costos de producción que no se ven igualados con la demanda local, además que la competencia regional de productos lácteos beneficiada por la inexistencia de aranceles de importación, lo que acaba generando una gran diferencia entre los precios con relación al producto artesanal, lo cual influye mucho en el consumidor.

El interés por el monitoreo de la eficiencia de la pasteurización de la leche debería ser en el país de gran importancia, ya que la deficiencia en la pasteurización puede generar graves consecuencias en la salud de los consumidores de ésta, como de sus derivados, sobre todo las mujeres en embarazo. Recientemente la OMS y la FDA advirtió especialmente a las mujeres en estado gestante no consumir productos lácteos sin pasteurizar, por el riesgo que representa al feto la presencia de la *Listeria monocytogenes*.

3.2 LECHE

La leche es un líquido opaco, blanquecino o amarillento segregado normalmente por las glándulas mamarias de las hembras de todos los mamíferos. Su finalidad en la naturaleza es la nutrición de las crías del animal que la produce. (35)

La leche normal no aparece hasta cinco días después del alumbramiento de las crías, siendo el calostro lo que las mamas segregan durante los primeros días. La leche es la única sustancia natural que puede servir de alimento único, ya

que es un producto completo; por suministrar elementos nutritivos de calidad apropiada y en cantidad suficiente. Como casi todos los alimentos, la leche contiene grasa, proteínas, carbohidratos, minerales y factores accesorios, como vitaminas, fosfolípidos (fosfátidos) y enzimas. (19).

La leche es una emulsión estable (la leche entera está compuesta en un 80 a 90 % de agua) y la interfase grasa-agua está estabilizada por los emulsionantes naturales adsorbidos presentes en la leche, los principales emulsionantes son las proteínas que son adsorbidas alrededor de cada glóbulo de grasa, también están presentes otros emulsionantes como los fosfolípidos (lecitina y vitamina A). La leche es una importante fuente de calcio y riboflavina (vitamina B₂), razón para considerar a la leche un alimento tan valioso, ya que contribuye con toda clase de nutrientes.

Sin embargo, la leche fresca es deficiente en algunos nutrientes como: hierro, ácido nicotínico y vitamina D, así como también en ácido ascórbico (vitamina C).

Las proteínas más importantes de la leche son la caseína (2.6%), que precipita en condiciones ácidas y las lactoalbúminas (0.12%) y lactoglobulinas (0.3%); estas últimas son proteínas del suero que permanecen en soluciones después de la acidificación. Las proteínas de la leche son de excelente calidad nutritiva, porque la composición de sus aminoácidos es muy completa y porque estos suplementan otras proteínas que carecen de uno o varios de los aminoácidos

esenciales. La caseína existe dispersa en la leche en forma de sal de calcio, acompañada con el fosfato de calcio.

La caseína es una fosfoproteína; la lactoalbúmina y lactoglobulina son proteínas simples. Estas últimas se coagulan en gran parte manteniendo la leche a 85 °C durante quince minutos, mientras que para coagular la caseína es necesario calentar hasta 138°C. La caseína no es una sola sustancia sino una familia de proteínas que contienen fósforo y se unen con calcio y otros minerales. Las partículas coloidales de la caseína son estabilizadas por una capa eléctrica originada por la presencia de iones enlazados de calcio y magnesio. Las partículas cargadas son sensibles a los cambios en el pH y en la concentración de iones circundantes. (17), (19)

3.3 LECHE CRUDA

Según la Norma Salvadoreña 67.01.01:06, la definición de leche es la siguiente: Producto íntegro, no adulterado, ni alterado, del ordeño higiénico regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas que no contenga calostro y que este exento de color, sabor, olor y consistencia anormal.

La leche cruda es un producto que no ha sufrido ningún tratamiento de saneamiento que le permita asegurar una mejor conservación. Su producción y su comercialización deben ser severamente controladas para evitar los riesgos que pudiesen ocasionar en la salud de los consumidores. Para ello la leche debe:

- Provenir de animales exentos de brucelosis y tuberculosis (enfermedades transmisibles del animal al humano) dentro del cuadro de la profilaxis colectiva obligatoria.
- De explotaciones bien establecidas.
- Manipularse (ordeño, envasado, almacenamiento) en condiciones higiénicas satisfactorias;
- Cumplir con criterios microbiológicos determinados (testigos de contaminación) hasta la fecha límite de consumo. ⁽²⁰⁾

3.4 LECHE PASTEURIZADA

Es la leche fresca y pura natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida a un proceso tecnológico de temperatura adecuado, por un cierto periodo de tiempo y posterior enfriamiento con rapidez, para asegurar la destrucción de los microorganismos patógenos no esporulados y que reduzca significativamente el contenido microbiano total, sin modificación sensible de su naturaleza físico-química y características nutritivas y sensoriales.

3.4.1 PROCESAMIENTO DE LA LECHE

1. Ordeño:

El procesamiento de la leche debe considerarse desde su ordeño el cual debe realizarse bajo las condiciones más higiénicas posibles evitando todo tipo de contaminación, el cuarto de ordeño debe estar ventilado y protegido contra la entrada de toda clase de animales insectos y roedores. Las vacas

deben estar sanas, libres de enfermedades que puedan transmitir al ser humano.

2. Filtración:

La leche obtenida del ordeño debe ser filtrada de manera apropiada e higiénica enfriada a una temperatura no mayor de 10°C y mantenida fría hasta su llegada a la planta de procesamiento de la leche. ⁽²⁶⁾

3. Recepción de la leche en la planta procesadora:

El primer paso en el procesamiento puede consistir en la mezcla adicional de los diferentes ordeños de leche para lograr un contenido específico de grasa. Durante este tiempo la leche se mantiene refrigerada a 4°C. ⁽³⁵⁾

4. Higienización o Clarificación de la leche:

Es un proceso físico-mecánico que por medio de la fuerza centrífuga se separan de la leche todas aquellas sustancias que no forman parte constitutiva de la leche, dejándola completamente libre de impurezas, es decir sedimentos extraños, por lo cual toda la leche cruda debe tratarse por este proceso para obtener productos lácteos de alta calidad. La clarificación, elimina el sedimento, las células de la ubre de la vaca, y partículas extrañas; con ello la leche está lista para ser sometida a la pasteurización. ⁽²⁶⁾

5. Homogenización y el desnatado de la leche:

Es el proceso por medio del cual se rompe la columna de crema que se forma en la superficie de la leche cuando coalescen las partículas de grasa butírica contenida en la crema, esta es incorporada a toda la leche, de

manera que no haya separación de los glóbulos de grasa, su finalidad es obtener un cuerpo homogéneo. En este proceso se subdividen los glóbulos y racimos de glóbulos de grasa presentes en la leche, hasta partículas tan pequeñas que ya no suban a la superficie de la leche formando una segunda fase, sino manteniéndolos dispersos dentro del seno de la leche. Los glóbulos de grasa tienen una densidad relativa inferior a la de la fase líquida y, por lo tanto, ascienden a la superficie para formar nata (crema) cuando se deja reposar la leche en un recipiente. Impidiendo así que la grasa de la nata se separe del resto del producto. El proceso puede realizarse previo o posteriormente al proceso de pasteurización. Este consiste en el paso de la leche a presión a través de distintas rendijas muy finas a una temperatura que oscila entre 55 y 65 °C, bajo una presión de 150 a 200 atmósferas. La leche entera se pulveriza a presión a través de pequeñas boquillas, el tamaño de los glóbulos de grasa se reduce hasta tal punto que posteriormente no se separan; a ello se debe que esa leche produce menos nata en comparación con la que no es procesada por medios mecánicos. Este producto recibe el nombre de leche homogenizada.

Para el desnatado de la leche es necesaria la utilización de una centrifugadora, para acelerar la separación de la grasa de la leche entera. El producto que se obtiene después de retirada la grasa recibe el nombre de leche desnatada o descremada. La leche con la mitad de grasa es conocida como semidesnatada o semidescremada. (26), (35)

6. Pasteurización u otro tipo de procesamiento térmico:

Proceso de calentamiento de un líquido, en particular de la leche, a una temperatura que oscila entre 62.8-72°C o a mayores temperaturas (según el tipo de tratamiento térmico) para destruir las bacterias perjudiciales, sin producir cambios materiales en la composición, en el sabor, o en el valor nutritivo del líquido.

Su objetivo es la eliminación de cualquier organismo generador de enfermedades que la leche pueda contener, además de la reducción considerable de la cuenta bacteriana total a fin de mejorar su capacidad de conservación. Prácticamente toda la leche, con el fin de garantizar su aptitud para el consumo humano, debe ser sometida al proceso de pasteurización y se mantiene refrigerada a una temperatura baja antes de pasar a los tanques de almacenamiento, de los que sale fría y pasa directamente al depósito de las maquinas envasadora para su envasado y su distribución. ⁽¹⁹⁾

7. Envasado y Almacenamiento:

Este proceso ha de llevarse a cabo con máquinas llenadoras y envases estériles para así impedir que el procesamiento sea infructuoso y mantener la integridad de la leche sin contaminaciones externas. El almacenamiento de la leche así tratada se realiza a una temperatura de 4°C lo cual la conserva por una semana en refrigeración.

En la actualidad el envasado más explotado de la leche se realiza por dos procesos:

1. Proceso TETRAPAC: En envases constituidos por un empaque los siguientes materiales unidos entre sí: polietileno-aluminio-polietileno–cartón-polietileno. Presentados en una caja poliédrica, que permite una duración del producto, con tratamiento UHT de 4-6 meses a temperatura ambiente, llamado también empaque de larga vida.
2. Proceso PREPAC: En envases constituidos por capas de polietileno de alta densidad presentados en forma de bolsa. Lo cual le permite al producto; con tratamiento UHT, tener una duración de 45 días a temperatura ambiente.

3.5 QUESO

El queso en general, es el producto elaborado a base de la cuajada de la leche de vaca y de otros animales; la cuajada se obtiene mediante la coagulación de la caseína presente por la adición de la enzima Renina, con o sin tratamiento adicional durante el proceso, por calor, presión, sal y maduración (generalmente por medio de organismos seleccionados). ⁽³¹⁾

La enorme variedad de condiciones a que puede someterse la cuajada obtenida de la leche hace posible producir un número casi infinito de quesos. Esas condiciones son: el contenido de humedad de la cuajada, el contenido relativo de proteínas y grasas, las combinaciones de temperatura a que puede someterse la cuajada al madurar y los microorganismos que persisten en ella por las condiciones a que se somete la cuajada o los microorganismos inoculados en ella. ⁽¹⁹⁾

La fabricación del queso consiste en la coagulación de la leche y su conversión en una dispersión coloidal en un gel conocido como cuajada, y la subsiguiente liberación de agua en forma de suero. El contenido de agua disminuye en un 87% durante el procesamiento de la leche cuando se transforma en queso lo que determina la dureza y las propiedades de conservación del queso, y esto depende de varios factores: Temperatura, pH y la manera como se corta la cuajada, salado, etc. (17)

La formación del queso se da cuando la caseína coagulada reacciona con los iones de calcio para producir un gel tridimensional que tiene la forma de un grumo firme llamado: Caseinato de calcio. La caseína existe en la leche en forma de caseinato de calcio, en forma de partículas extremadamente pequeñas en suspensión. La coagulación con renina del caseinato de calcio de la leche tiene lugar en tres fases:

-La primera es la transformación del caseinato de calcio en paracaseinato de calcio no coagulado, por la acción de la renina.

-La segunda es la producción bacteriana de ácido láctico, en donde el ácido pone al calcio en forma de iones.

-La tercera fase es la acción física y química de los iones de calcio sobre el caseinato de calcio para obtener paracaseinato de calcio coagulado (cuajada).

(17), (19)

Por error o desconocimiento algunos procesadores acostumbran destinar la leche de peor calidad para quesos, como una alternativa para no perderla. (48).

Lo cual contribuye a la pérdida de calidad en los productos queseros que se elaboran de ella, ya que el tratamiento térmico de las leches usadas como materia prima del queso tiene por objeto la destrucción de los microorganismos o sistemas enzimáticos que son perjudiciales en el proceso quesero o la destrucción, en el caso de las bacterias patógenas, las que sean peligrosas para el consumidor de queso. En el caso de leches destinadas a queso, generalmente se admite que los estándares mínimos para el tratamiento térmico de las leches queseras deben de ser los mismos que los de la leche líquida, con lo que se erradican de todas las leches los microorganismos patógenos. Aunque algunos técnicos queseros deseosos de conservar la actividad lipasa de la leche cruda prefieren emplear los tratamientos térmicos ligeros a baja temperatura, unos $65,5^{\circ}\text{C}$, con o sin tiempos de retención; aunque estos tratamientos no inactivan a las lipasas permiten que en la leche de quesería sobrevivan bacterias nocivas o perjudiciales (patógenos y algunos coliformes). Los quesos de larga maduración y prolongado almacenamiento permiten que con el transcurso del tiempo mueran las bacterias patógenas, pero los quesos de vida breve y los quesos blandos pueden contener aún patógenos viables, si la leche usada para hacer queso contenía patógenos. Los quesos hechos de leche no pasteurizada deben madurar por lo menos 60 días a una temperatura no menor de $35^{\circ}\text{F} = 2^{\circ}\text{C}$. Durante este periodo de almacenamiento mueren algunas bacterias patógenas que pudieran estar presentes en la leche. (4), (39)

3.6 QUESO MADURO

Se entiende por “queso curado o madurado” al queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que deberá mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de un queso maduro. Durante la maduración aumenta el contenido del nitrógeno soluble en agua, del nitrógeno amínico; componentes principales del aroma de algunos quesos se pueden encontrar a concentraciones de 0.5 a 1.1% (nitrógeno soluble) en agua, y es el producto de la desaminación de los aminoácidos y se encuentra en forma de sal. También parte del nitrógeno amoniacal, (el cual es producto intermedio del metabolismo proteico del animal donde se generan amoniaco, urea, creatina, ácido úrico), y los ácidos volátiles.

La lipasa de la leche está ausente en el queso fresco, y a los 5-20 días después de su fabricación empiezan a aparecer las lipasas de origen bacteriano. Por consiguiente, se les atribuye la hidrólisis de la grasa que tiene lugar durante la maduración del queso. Al igual que la proteinasa activa en la maduración del queso es en gran parte de origen bacteriano. ^{(19), (42), (43)}.

La caseína desempeña tres funciones en la preparación del queso:

1. Aprisiona en la cuajada los glóbulos de grasa y las sales en forma de fosfatos y los retiene firmemente durante el proceso de la preparación del queso.
2. Retiene suero y agua en cantidades suficientes para permitir el desarrollo correcto y la maduración del queso.

3. Es el material que produce los sabores característicos cuando el queso madura. ⁽¹⁹⁾

Las bacterias del ácido láctico se desarrollan en el queso ácido no madurado y las enzimas presentes en las mismas efectúan varias reacciones químicas que son responsables del sabor y el aroma. Una semana después de iniciada la fabricación ha desaparecido toda la lactosa, ya que ha sido convertida en ácido láctico. Además de la descomposición de la lactosa, la maduración consiste principalmente en el desdoblamiento de las proteínas y las grasas. Las proteínas son descompuestas por la hidrólisis enzimática efectuada por la renina y otras peptidasas. Las proteínas son desdobladas progresivamente en moléculas más pequeñas como las peptonas, y finalmente en aminoácidos. Estos compuestos solubles nitrogenados de un bajo peso molecular contribuyen de cierto modo al sabor del queso, y, además, producen cambios físicos en el queso, que lo hacen más blanco y cremoso. Las grasas, al igual que las proteínas son descompuestas por hidrólisis enzimática y se convierten en glicerol y ácidos grasos libres. La grasa de la leche es relativamente rica en ácidos grasos de bajo peso molecular, al ser volátiles y de olor fuerte, contribuyen al sabor del queso. Los aminoácidos y los ácidos grasos producidos por la descomposición de las proteínas pueden ser hidrolizados aún más por las enzimas que producen moléculas de bajo peso molecular, como aminoras las cuales se generan con la descarboxilación de los aminoácidos provocando la liberación de aminoras como la putrescina derivada de la ornitina, la cadaverina a

partir de la lisina, el ácido amino butírico del ácido glutámico y la histamina del triptófano respectivamente. Estas son las responsables de un olor agradable o desagradable según la concentración a la que se encuentren en el queso así como los aldehídos y cetonas que son volátiles y de sabor fuerte, contribuyen también al sabor del queso maduro. (17), (43)

Durante la maduración del queso, las caseínas son hidrolizadas por las enzimas coagulantes, plasmina y proteasas bacterianas generando diferentes fosfopéptidos. Sólo tras la acción conjunta de proteasas y fosfatasa puede obtenerse una degradación completa de las caseínas. Aunque la fosfatasa ácida se sitúa en la fase acuosa de la leche, perdiéndose gran parte de ella en el suero de quesería, podemos detectar alguna actividad de esta enzima en el queso. De esta forma la fosfatasa ácida, que desfosforila las caseínas hidrolizadas por las enzimas proteolíticas en el queso, podría tener una función importante en el madurado y desarrollo del flavor del queso.

3.7 QUESO FRESCO

“Queso sin curar, sin madurar o fresco” es el queso que esta listo para el consumo poco después de fabricado, de corta duración, y conservado a temperaturas bajas.

Este está listo para consumirse tan pronto como se ha elaborado. Caracterizado por su alto contenido de humedad y bajo contenido graso y gran valor nutritivo por su contenido en proteínas. El queso no madurado bajo en humedad se

puede almacenar por algún tiempo, en contraste con el queso de alta humedad, que debe consumirse pronto una vez elaborado ^{(4), (21)}.

La cantidad de queso fresco producido depende de tres factores:

1. Del porcentaje de grasa más caseína en la leche,
2. De los porcentajes de grasa y caseína perdidos al hacer el queso y
3. Del porcentaje de agua retenida en la cuajada.

El queso fresco suele contener aproximadamente 37% de humedad, esto puede ser regulado por los técnicos queseros durante su preparación según el cortado de la cuajada, la temperatura al calentar la cuajada, el grado de acidez, la cantidad de sal usada y la manipulación de la cuajada. ⁽¹⁹⁾

3.8 FABRICACION GENERAL DEL QUESO

1. Refrigeración o tratamiento térmico de la leche en el momento de su recepción. En el momento de la recepción en la fábrica, la leche debe enfriarse hasta una temperatura entre los 2 a 4 °C con objeto de limitar el desarrollo de la flora psicrófila. En el fin de semana, su utilización debe retrasarse varios días, por lo que es mejor someterla primero a una pasteurización baja o termización: El cual es un tratamiento térmico que se aplica para prolongar el tiempo de almacenamiento de la leche antes de someterla a una pasterización o tratamientos más severos, y almacenar después a baja temperatura en un material totalmente aséptico. La leche se trata por 15 segundos a temperatura entre los 57- 72 °C. Este tratamiento se realiza en las 36 horas siguientes a la obtención, prolongando el tiempo de

almacenamiento hasta por 7 días sin pérdidas de calidad si se mantiene entre 0 y 1°C y en contenedores estériles. La termización es empleada por algunos técnicos queseros para calentar la leche de quesería con objeto de experimentar pocos cambios químicos y proceder luego a la fabricación del queso. Pero la aplicación de este sistema requiere ineludiblemente que la leche contenga escaso número de microorganismos y que esté exenta de bacterias patógenas, ya que el efecto germicida es relativamente bajo. Pero el calentamiento de la leche para quesería debe realizarse siguiendo el procedimiento de la pasteurización rápida. ⁽²⁸⁾

2. Pasteurización y homogenización de la leche: Antes de su utilización, la leche, conforme a la legislación, debe someterse a un proceso de pasteurización para obtener una calidad higiénica y prepararla para la flora láctica.
3. Preparación de los microorganismos lácticos: Los microorganismos mesófilos que se utilizan en la fabricación del queso, llamados también: “starters” o “iniciadores”, se cultivan preferentemente en cubas estériles a una temperatura de unos 18-22°C en una leche reconstituida con un 10-11% de leche en polvo exenta de inhibidores para posteriormente agregarlos a la leche.
4. Siembra de la leche: Se lleva a cabo a una concentración comprendida entre el 1% y el 3%, en un tanque a una temperatura aproximada a los 20°C.

5. Acidificación: La leche sembrada se reparte en tinas de capacidad variable, y se agrega el cuajo diluido de 2 a 10 veces su volumen de agua, se incorpora a razón de 5 a 10 mL de cuajo, en relación 1/10,000⁸ por cada 100 litros de leche, en el momento en que comienza a desarrollarse la acidez en la leche.

(21)

6. Coagulación: La coagulación se lleva a cabo generalmente en tanques de diversas capacidades, en los que se inicia el proceso generalmente cuando el pH alcanza el valor de 5.8 y continua hasta que esté comprendido entre 4.50 y 4.55 para un suero cuya acidez tiene un valor de 55-60° D (0.16% a 0.2 % de ácido láctico). Para obtener un producto de calidad, con un rendimiento correcto, el tiempo de coagulación no debe exceder las 18 horas. Mientras dura esta operación, es conveniente cubrir los tanques para protegerlos de contaminaciones.

7. Moldeado y desuerado: El suero que sobrenada se elimina por un procedimiento apropiado y la cuajada se moldea siguiendo diversos procedimientos por medio de multimoldes, cucharones y herramientas especiales. Después, se escurre el tiempo necesario para que se obtenga el extracto seco deseado. Generalmente el escurrido se realiza en una habitación a temperatura controlada, aproximada a 18-20 ° C, aunque cuando se requiere obtener un producto de alta calidad, se lleva a cabo en cámaras frías (8-10 ° C). El tiempo de desuerado dependerá de la manera con que se realice la sinéresis; la extracción del suero será de 6-8 horas

después del cortado de la cuajada. Sinéresis en tela empleando sacos: 10-12°C al final del desuerado 8 horas, 4 vueltas. Empleando filtro, 18-20°C 8 A 20 horas, movimiento permanente. ⁽²¹⁾

8. Empacado: Ha de empacarse con protección local por aire filtrado o con flujo laminar, en frío a una temperatura de 4°C, de preferencia el empacado al vacío.

9. Almacenamiento en frío: En cuartos refrigerados a una temperatura entre 4°C a 10°C. ⁽²¹⁾

3.9 PASTEURIZACION.

Proceso que emplea un calor ligero para reducir las poblaciones microbianas en la leche y otros productos que son excepcionalmente termosensibles. La pasteurización de la leche, se empleó originalmente para matar las bacterias patógenas, especialmente aquellas que producen zoonosis. En este sentido la pasteurización de la leche juega un papel muy importante en la prevención de la diseminación de enfermedades infecciosas, donde la leche pueda ser el principal medio de transmisión. ⁽³⁾

La pasteurización también mejora las características de almacenamiento de la leche, este es otro objetivo de la pasteurización, el proteger a estos alimentos frente al deterioro enzimático y al deterioro microbiano durante el almacenamiento y así pueden conservar su calidad y seguridad higiénica durante una o dos semanas de almacenamiento en refrigeración. Las formas vegetativas de los microorganismos son destruidas a temperaturas más bajas

que la mayoría de las enzimas, aunque con ellas también la leche pierde durante el proceso térmico aminoácidos, y otras sustancias vitamínicas que son sensibles al calor. (31)

El tratamiento térmico requerido no es único, ya que se pueden emplear varias condiciones de tiempo-temperatura para lograr el objetivo, pero se prefieren los de altas temperaturas y cortos tiempos. Seguidos de un descenso brusco de temperatura, para garantizar la eficiencia del procedimiento. La leche pasteurizada no está estéril, de manera que es preciso enfriarla rápidamente después de la pasteurización a fin de prevenir la multiplicación de las bacterias sobrevivientes. (20), (33)

El tratamiento térmico de la leche se compone de dos partes separadas. Una es la temperatura a la que la leche se calienta y la segunda el tiempo durante el cual la leche se mantiene a dicha temperatura. A esta última fase se le conoce como “tiempo de retención”. Este tiempo de retención es una parte esencial del tratamiento calorífico eficaz, ya que no todos los microorganismos o enzimas indeseables resultan instantáneamente destruidos a las temperaturas de tratamiento. Algunas bacterias pueden simplemente sufrir un “choque térmico” transitorio, del que después pueden recuperarse. Algunos técnicos queseros prefieren olvidarse del tiempo de retención y basarse únicamente en la temperatura para efectos de conservar las características de olor y sabor en los quesos, otros prefieren, en cambio usar temperaturas más bajas que las de pasteurización al objeto de retener algunas enzimas ya presentes en la leche

cruda (principalmente la lipasa), sin embargo la leche de quesería debe de someterse a temperaturas superiores a la de pasteurización, entre 75°C-80°C.

(39)

Paralelamente a la destrucción de organismos patógenos, también se eliminan los microorganismos más termosensibles, como los coliformes, y se inactiva la fosfatasa alcalina, pero no así las esporas, las bacterias un poco más termorresistentes, como las lácticas y tampoco la enzima lactoperoxidasa; es decir, la leche pasteurizada todavía tiene una determinada cuenta microbiana, principalmente de bacterias lácticas (no patógenas pero si fermentativas), y requiere de refrigeración, ya que su vida de anaquel es tan sólo de algunos días.

Con temperaturas superiores a los 25°C, mueren los microorganismos psicrófilos; arriba de los 42°C, mueren los mesófilos aerobios (coliformes); y superiores a 60°C, mueren los termoresistentes (*Salmonella*). (20)

Deben tenerse los cuidados pertinentes para llevar a cabo un procesamiento térmico adecuado.

En los intercambiadores de calor, placas de pasteurización, donde se establece el equilibrio térmico de la leche pasteurizada caliente y la leche cruda fría, una ruptura y picadura en las placas puede generar fosfatasa alcalina positiva, es decir partículas de leche cruda en leche pasteurizada; el mal funcionamiento de la válvula de diversificación, puede dejar pasar leche a temperatura más baja que la de pasteurización. Excesiva velocidad de la bomba de tiempo, es decir

más flujo en el mismo tiempo y como resultado menos temperatura por libra de leche, da como resultado leche cruda contaminada.

Las partículas de componentes lácteos, quemadas y adheridas a las superficies de intercambio calorífico, así como los sedimentos, el aire mezclado y la velocidad escasa de la corriente de los medios puede reducir considerablemente el coeficiente de transmisión térmica, disminuyendo así el efecto germicida. (28)

En cuanto a los pasteurizadores, aunque parezca paradójico, en ciertos casos la pasteurización en vez de constituir un elemento destructor de los microorganismos, contribuye a su contaminación, cuando en la maquina pasteurizadora se anidan gérmenes resistentes a las altas temperaturas. (24)

La leche pasteurizada acondicionada o de alta calidad tiene un tiempo de conservación entre el envasado y el consumo de 7 días como máximo. (20)

3.9.1 TIPOS DE PASTEURIZACION Y ESTERILIZACION

Existen los procesos térmicos de: Pasteurización lenta, rápida y esterilización a ultra temperatura.

3.9.1.1 Pasteurización lenta o pasteurización baja, pasteurización discontinua. Este método también es llamado LTLT (Low Temperature Long Time)

Se define como un calentamiento de la leche cruda, con agitación continua, a 62.8-65.6°C (145°F) durante 30 minutos, con enfriamiento posterior.

Es un método lento y discontinuo, pero presenta la ventaja de no modificar las propiedades de la leche, es ideal para procesar pequeños volúmenes de leche. No se coagulan las albúminas ni las globulinas y el estado de los glóbulos grasos permanece inalterado. (34), (41)

Este tipo de pasteurización responde al principio conservador del valor nutritivo de la leche. El efecto germicida, sin embargo, es inferior al exigido cuando la leche contiene inicialmente muchos microorganismos. (28)

La leche se calienta por medio de vapor o agua caliente que circula entre las paredes del tanque de acero inoxidable, a 62.8°C durante 30 minutos, usando un agitador para hacer más homogéneo el tratamiento. Una vez calentada la leche se enfría a una temperatura menor 10°C (50°F) por medio de una corriente de agua fría a través de una camisa de doble fondo por donde pasa el líquido enfriante que puede ser agua fría o salmuera lo cual hace descender la temperatura de la leche, esta descende gradualmente por lo que la leche permanece un tiempo considerable a las temperaturas de desarrollo de algunos microorganismos, lo cual provoca una aumento de la cuenta microbiana; o por medio de una cortina de enfriamiento o enfriador de superficie lo cual no es muy higiénico pues la leche no está aislada del medio ambiente. (38)

3.9.1.2. Pasteurización rápida, alta o “en destello” ⁽³⁾, también conocido como alta temperatura en corto tiempo (HTST) High Temperature Short Time.

Este sistema es continuo, provisto de tres secciones de placas, la primera como sección de regeneración en la cual la energía calorífica de la leche pasteurizada se intercambia por energía frigorífica de la leche cruda, razón por la cual en este sistema debe procesarse leche fría. La leche fría cruda recibe la energía calorífica de la pasteurizada como precalentamiento, posteriormente pasa a la sección dos, de calentamiento final y al tubo de sostenimiento, finalmente a la sección de enfriamiento. Este proceso se basa en mayor temperatura en la superficie de contacto, en menos tiempo: Entre 71-75°C por un tiempo de 15 segundos u 88.3°C por 1 segundo hasta 100°C por 0.01 segundo. ⁽²⁶⁾

La pasteurización alta es preferida, por su elevado efecto germicida, cuando la calidad higiénica de la leche cruda es mala. La mayoría de desnaturalizaciones se producen por encima de 75°C. La albúmina y la globulina se coagulan en el 20% aproximadamente. Se inactiva, además de las enzimas inactivadas a bajas temperaturas; también la lactoperoxidasa. La pasteurización rápida produce la coagulación de escasas cantidades de albúmina y globulina, pequeña precipitación de sales cálcicas, índice bajo de grupos sulfhidrilo (-SH) por liberación de CO₂, las vitaminas apenas se modifican pero la fosfatasa alcalina es inactivada con una reactivación posterior. ⁽²⁸⁾

El proceso es satisfactorio ya que modifica en menor grado el sabor y puede llevarse a cabo como un flujo continuo permitiendo su adaptación a grandes operaciones lácteas. Las propiedades de la leche se conservan mejor en la leche que se somete a la pasteurización rápida. Por eso este proceso es el más adecuado para la leche destinada a quesería. La pasteurización a estas temperaturas no produce el sabor desagradable de leche cocida y afecta muy poco su valor nutritivo, aunque puede ocurrir un pequeño grado de destrucción vitamínica. (2), (9), (29), (37)

En el método de pasteurización continua HTST, la leche cruda pasa de los tanques de almacenamiento a 4.5°C (40°F) al tanque regulador de donde sale a través de una bomba hacia el cambiador de calor en donde se calienta por regeneración o precalentamiento, a 58.3°C (136.8°F) luego a través de un filtro que elimina las impurezas, después a los cambiadores de calor de la sección de calentamiento, donde su temperatura se eleva a 72.7°C (163 °F) mediante agua caliente. Posteriormente la leche circula por la sección de retención de temperatura durante 15 segundos, luego pasa a una válvula de diversificación donde, la leche que no alcanza los 72.7°C, automáticamente es retornada al tanque de alimentación o regulador para ser reprocesada. Pero si la leche alcanza la temperatura mencionada pasa a la sección de regeneración o precalentamiento donde es enfriada por la leche cruda hasta 17.9°C (64.2°F), luego la leche circula hacia la sección de agua fría, también llamada:

Preenfriamiento o directamente a la sección de enfriamiento, en donde su temperatura disminuye a valores inferiores a 10°C (50°F). (42)

3.9.1.3 Sistema Ultra-Temperaturas o Ultra Pasteurización (UHT):

La ultra pasteurización, designada también como ultra esterilización o procedimiento de temperatura ultra alta (UHT). Posee un efecto germicida muy elevado gracias a la acción de la alta temperatura durante un tiempo de retención extremadamente breve. Sin embargo, las modificaciones físico-químicas son equivalentes a la pasteurización rápida o alta. El sabor a cocido que se origina desaparece a los pocos días. La ultra pasteurización se emplea solamente para obtención de leche de consumo como bebida y leches aromatizadas. (28)

Funciona con temperaturas sobre 212°F = 100°C, generalmente entre los 135°C y 150°C por 2 a 4 segundos. La leche UHT o ultra pasteurizada presenta inmediatamente después de su procesado un fuerte sabor azufrado, debido a la desnaturalización de β -lactoglobulinas y formación de grupos sulfhidrilo (-SH), que va disminuyendo con el almacenamiento.

Se realiza a través de equipos que calientan el producto a través de agua caliente provistos de controles permanentes tales como termómetros, termógrafos y un control de emergencia llamado válvula de diversificación, la cual se cierra automáticamente cuando la temperatura está por bajo de la adecuada, impidiendo el paso de producto que no haya sido correctamente

calentado; está regulado por una bomba de tiempo que mide el flujo de producto en función del tiempo de contacto. (27)

La leche esterilizada, al contrario de la pasteurizada, puede conservarse a temperatura ambiente durante varios meses, siempre que no se abra el recipiente, sin agriarse, ni descomponerse a causa del desarrollo bacteriano. Este tipo de pasteurización es considerada de larga vida porque le confiere al producto un periodo de duración entre 4 a 6 meses a temperatura ambiente. Una vez abierto el recipiente la leche puede contaminarse con bacterias del exterior y perder sus propiedades de la misma forma que la leche pasteurizada.

(27), (34)

3.9.2 VENTAJAS EN LA PASTEURIZACION DE LECHE DESTINADA A QUESERIA.

-Se destruyen todos los microorganismos patógenos que puedan transmitir una zoonosis e infecciones a través de la leche.

-Aumento del rendimiento a la desnaturalización de las proteínas solubles, hay una mayor retención de grasa en la cuajada, además se presenta un ligero aumento de nitrógeno, cuando la leche es sometida a elevadas temperaturas, tanto lactoalbúminas como lactoglobulinas precipitan rápidamente constituyendo una mayor fracción proteica. (14)

3.9.3. DESVENTAJAS EN LA PASTEURIZACION DE LECHE DESTINADA A QUESERIA.

-Disminuye la aptitud para la coagulación del cuajo, es decir aumenta su tiempo de formación, el calentamiento reduce la calidad de la leche para coagular, la cuajada obtenida es menos dura y el desuerado es difícil.

-El aroma y la textura del queso no es tan bueno como el del que se obtiene a partir de leche cruda. La modificación en la textura se debe probablemente a las globulinas que se ligan a la caseína y aumentan la retención de agua en la cuajada.

-Incrementan los costos de producción, ya que el equipo de pasteurización es de elevado costo. (14).

Cuadro N° 1: Sistemas de Calentamiento más empleados.

Sistema	Temperatura en °C	Duración del calentamiento	Efecto germicida en %
Pasteurización baja o lenta (LTLT)	62-65	30 min.	95
Pasteurización rápida o alta (HTST)	71-75 88.3-100	8-15 seg. 0.01-1 seg.	99.9
Ultra pasteurización (UHT)	135-150	2-8 seg.	99.9 a 100

3.10 ENFERMEDADES CAUSADAS POR INGESTA DE PRODUCTOS LACTEOS NO PASTEURIZADOS

La leche tanto como sus derivados son alimentos de alto valor nutritivo, esenciales en la dieta del ser humano; por consiguiente, muy sensibles a la contaminación por microorganismos patógenos, que pueden sobrevivir a los procesos de transformación de la leche y volver así a los productos derivados un peligro a la salud de los consumidores.

Así, la leche puede ser no solo el vehículo principal de transmisión sino también el medio de cultivo en el que a condiciones adecuadas de tiempo y temperatura los microorganismos se multipliquen hasta llegar a ser los suficientes en número que provoquen graves infecciones al ingresar al organismo humano. Algunas enfermedades causadas por microorganismos patógenos presentes en la leche o quesos son:

-Shigelosis (disentería bacilar), causado por: ***Shígella sonnei***, ***Shígella flexneri***, ***Shígella disenteriae***, ***Shígella boydii***.

-Brucelosis causada por: ***Brucella melitensis***, ***Brucella abortus***.

-Difteria, causada por: ***Corynebacterium diphtheriae***.

-Fiebre tifoidea y paratifoidea, causadas por: ***Salmonella thyphi*** y ***Salmonella paratyphi***.

-Infecciones por Estreptococos β -hemolíticos, causadas por: ***Streptococcus pyogenes***.

-Tuberculosis, causada por: ***Mycobacterium tuberculosis***.

-Yersiniosis, causada por: ***Yersinia pseudotuberculosis***, ***Yersinia enterocolitica***.

-Listeriosis, causada por: ***Listeria monocytogenes***. (2), (14), (36), (40)

El tratamiento normal de pasteurización HTST es suficiente para la inactivación de la ***Listeria monocytogenes*** presente a niveles normales en la leche.

Algunos quesos blandos, y la leche no pasteurizada (así como los productos derivados de ésta) así como también algunas comidas listas para consumir (como los fiambres y embutidos envasados) pueden provocar una forma de infección denominada: Listeriosis. Esta infección suele presentarse como una enfermedad con síntomas parecidos a los de la gripe, como fiebre, dolores musculares, escalofríos y, a veces, náuseas o diarrea. Sin embargo, puede complicarse con una meningitis (infección de las membranas que recubren el cerebro, con síntomas como dolores de cabeza fuertes y rigidez del cuello) potencialmente letal e infección sanguínea. Su diagnóstico y tratamiento temprano puede ayudar a prevenir infecciones fetales que pueden provocar aborto espontáneo y el nacimiento sin vida del bebé. La listeriosis se vuelve un riesgo de infección uterina durante el periodo de gestación pudiendo producir: aborto espontáneo o parto prematuro, nacimiento del niño sin vida (mortinato) o que el niño enferme gravemente luego de nacer (meningitis) e incluso su muerte. (31)

Estas complicaciones pueden ocurrir de 2-14 días después de la infección materna. Por lo cual este grupo de riesgo (Las mujeres embarazadas) deben

protegerse a sí mismas y a sus bebés de la listeriosis siguiendo las recomendaciones de la FDA:

-Evitar ingerir quesos blandos como el Camembert, Roquefort, queso azul, queso blanco, queso fresco o panela a menos que estén hechos con leche pasteurizada. Los quesos duros, los quesos procesados, el queso crema y el “queso cottage” no presentan riesgos.

La listeria se propaga a la temperatura del refrigerador. No consumir leche que no esté pasteurizada ni alimentos derivados de esta leche. ⁽⁴⁸⁾

3.11 FOSFATASA ALCALINA

3.11.1 Generalidades

La leche cruda contiene varias enzimas. Una de estas, que desempeña un papel importante en el trabajo a favor de la salubridad pública, es la fosfatasa alcalina. Esta enzima tiene un grado de susceptibilidad al calor que equivale casi exactamente a las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la pasteurización correcta. Por consiguiente si se descubre en una muestra de leche pasteurizada que la actividad de la fosfatasa alcalina está presente, esto comprueba que su procesamiento ha sido inadecuado o que la enzima ha sido reactivada. ⁽³⁴⁾

En la leche se distinguen dos tipos de fosfatasa, aunque ambas son fosfomonoesterasas; la fosfatasa ácida que se localiza en el lactosuero y la fosfatasa alcalina que se encuentra en la membrana del glóbulo graso. Son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. La fosfatasa ácida existe en la leche en muy poca proporción con respecto a la alcalina (2.5% a 7.5%). Las hidrolasas son enzimas que catalizan reacciones en las que el agua participa en la ruptura de enlaces covalentes de un sustrato con la adición concomitante de elementos del agua a los elementos de ese enlace. El nombre sistemático se forma como “sustrato hidrolasa”. El agua no se escribe como sustrato aunque lo sea, debido a que su concentración no cambia significativamente durante la reacción. ⁽³²⁾



Figura N°. 1: Sub unidad polipeptídica de la enzima fosfatasa alcalina. (56)

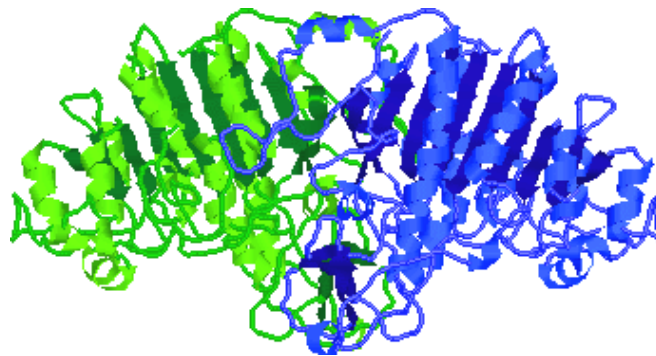


Figura N°. 2: Molécula de Fosfatasa Alcalina totalmente funcional. Homomultímera, Constituida por dos cadenas polipeptídicas idénticas; cada una con un sitio activo capaz de hidrolizar el fosfato. (56)

La fosfatasa alcalina necesita cuatro iones Zn^{2+} por molécula de enzima. Dos de los cationes Zn^{2+} tienen una función estructural. Contribuyen a mantener las dos subunidades del enzima juntas (manteniendo la estructura cuaternaria). Los otros dos Zn^{2+} están localizados en los dos centros activos del enzima; como

cofactores in vivo, donde tiene un papel de grupo “super ácido” que activa el grupo OH implicado en la hidrólisis del sustrato. (27)

La fosfatasa alcalina es un producto metabólico de las células mamarias, el nivel de ésta en la leche varía ampliamente dependiendo de la temporada, edad de la vaca, etapa de lactancia y producción de leche. El contenido de fosfatasa alcalina en la leche aumenta al final de la lactación; también se detecta una mayor actividad al principio del invierno.

Es una metalo-glico-proteína que contiene zinc y que exige dos tipos de metales para que se produzca su actividad máxima:

El Zinc, el cual es esencial (pero se puede reemplazar artificialmente con el cobalto) y El Magnesio, que es un ion estimulante. El magnesio sólo, no puede regenerar la actividad a partir del apoenzima desmetalizado, pues tiene acceso al lugar del zinc. Por el contrario, el zinc se puede fijar sobre los sitios del magnesio pero provocando una inhibición.

La fosfatasa alcalina está ligada a la materia grasa y desaparece en gran parte en la leche completamente desnatada, concentrándose en la nata. Se encuentra asociada a un complejo lipoprotéico de la membrana del glóbulo de grasa. Se la encuentra en el suero de mantequilla tras el batido. Constituye desde luego una parte importante de la capa absorbida sobre los glóbulos grasos a nivel de la membrana externa.

Se caracteriza por la ausencia de especificidad de sustrato. Las pruebas pueden aplicarse a la mantequilla y a los quesos utilizando un derivado nitrado

como el para-nitrofenilfosfato, para los quesos debe considerarse que algunos microorganismos, presentes normalmente en el curso de la maduración, segregan fosfatos, en especial las levaduras y los mohos, por lo tanto la prueba al principio podría ser negativa y luego positiva, sobre todo en los quesos pequeños, por lo cual siempre es necesario verificar si la fosfatasa no es de origen bacteriano.

El peso molecular es próximo a 170,000 A, es una glicoproteína que contiene ácido siálico, es sensible al calor pues se inactiva a 62°C durante 15 a 20 minutos o a 72°C durante 15 a 20 segundos. Los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} la activan y los iones Zn^{2+} , el yodo y la cisteína, la inhiben. (14), (45).

La fosfatasa alcalina u ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa (nombre sistemático), es una Estearasa que cataliza la hidrólisis de fosfatos orgánicos. La fosfatasa alcalina hidroliza monoésteres de ácido fosfórico a pH alcalino, siendo el pH óptimo de acción entre 9.8 y 9.9 (para los sustratos de bajo peso molecular) su pH óptimo depende de la naturaleza del sustrato. Con sustancias de bajo peso molecular el pH esta comprendido entre 9 y 10, por ejemplo con la fosfoserina; pero en la desfosforilación de la caseína ésta es más rápida a pH cercano a 7.0 (44).

Ya que se concentra principalmente en el glóbulo graso de la leche puede quedar incluida en el queso producido a partir de leche cruda, no así en los quesos elaborados con leche pasteurizada ya que es inactivada, aunque esta

se reactiva con el tiempo. Sin embargo, el pH de la mayoría de las variedades de queso limita su acción como hidrolasa. (24), (33).

El indicador más usado en la leche, queso y otros productos lácteos es la fosfatasa alcalina, la cual es de las enzimas más estables a los tratamientos térmicos no muy severos, que se encuentran en la leche. Sin embargo la prueba de la fosfatasa alcalina no es aplicable a todo tipo de pasteurización debido al fenómeno de reactivación, que se caracteriza por la reaparición de la actividad de la enzima. (31) (38).

Puede conocerse la intensidad de la pasteurización mediante la determinación de la actividad fosfatasa alcalina en el caso de pasteurización, y la lactoperoxidasa para los tratamientos más severos como el proceso UHT. (42)

La fosfatasa ácida, por su parte:

-Está asociada a la membrana del glóbulo de grasa.

-Es termo estable (es una de las enzimas más termorresistentes de la leche); se necesita un calentamiento a 88°C por 30 minutos o a 96° C por 5 minutos para inactivarla.

-Tiene un pH óptimo de 4.74. Es una proteína muy básica que es muy activa a los pH intestinales bajos.

-Muestra una gran actividad sobre la caseína, a la que desfosforila, haciéndola más reactiva y oxidable y aumenta su punto isoeléctrico lo que es importante en los procesos de fabricación basados en la coagulación de la caseína. (30)

-La fosfatasa ácida hidroliza monoésteres de ácido fosfórico a pH ácido, mostrando su mayor actividad en torno a pH 5.

-La fosfatasa ácida es muy estable en el intervalo de temperatura de 65 - 80°C, manteniendo por completo la actividad enzimática tras un tratamiento de pasteurización convencional.

La fosfatasa ácida es más exactamente una fosfoproteína fosfatasa. Puede hidrolizar la serina-fosfórica en la caseína cuando el pH es bajo, con su óptima actividad a pH 4.5, pero también puede hidrolizar el fenilfosfato, al igual que la fosfatasa alcalina. No es una metalo proteína y se parece mucho a la fosfoproteína fosfatasa de la nata. Son proteínas básicas, activadas fuertemente por el ácido ascórbico.

La fosfatasa ácida se encuentra a la vez en la leche desnatada y en la nata. Es una de las enzimas más termorresistentes de la leche, conserva su actividad hasta los 95° C. ⁽⁴⁴⁾

3.11.2 Características de la Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina posee las siguientes propiedades características:

-La capacidad para hidrolizar sustratos de fosfato orgánico en alcohol o fenol (si se trata de un fenilfosfato) y ácido fosfórico (esta propiedad se utiliza para su cuantificación).

-Es termolábil; por su termosensibilidad particular se utiliza como un indicador de tratamiento térmico ya que con la pasteurización baja se inactiva.

-Su pH óptimo es de 9.6 (de ahí su nombre de alcalina), y los pH altos promueven su actividad.

-Los iones Mg^{2+} y Mn^{2+} la activan; por el contrario, el Zn^{2+} , el I_2 y el Be^{2+} la inactivan, y el ácido glutámico, la lisina, los carbonatos y las sales de amonio la inactivan en un grado variable. Sin embargo, es insensible al fluoruro de sodio (NaF).

-De un 30 a un 40% se encuentra localizada en la nata, absorbida por los glóbulos grasos, y el resto se encuentra en las lipoproteínas.

-Una de las características de esta fosfatasa es su tendencia a reactivarse. El procesado a temperaturas altas o ultra altas y el almacenamiento por largos períodos a veces a temperatura ambiente favorecen la supervivencia de la actividad enzimática o reactivación. ⁽³²⁾

3.11.3 Mecanismos de reactivación de la Fosfatasa alcalina

El mecanismo por el cual la fosfatasa alcalina recupera su actividad catalítica puede explicarse por una de las siguientes razones:

- a) Requiere de grupos sulfhídricos (-SH) para su reactivación; cuanto más alta sea la temperatura del tratamiento, habrá una mayor cantidad de sulfhídricos disponibles de las proteínas de la leche, principalmente de las inmunoglobulinas, con la consecuencia de que la enzima se regenera más fácilmente durante el almacenamiento.
- b) Las estructuras secundarias y terciarias de la enzima fosfatasa alcalina no son muy complejas y pueden recuperarse después de la pasteurización.

c) Puede disociarse de su cofactor, durante el tratamiento térmico y posteriormente volverse a unir al metal para recuperar su actividad. La reactivación de la fosfatasa es más fácil en productos con alto contenido de grasa, como en las cremas procesadas por métodos de alta temperatura-corto tiempo, y además requiere de tratamientos que produzcan grupos sulfhidrilo (-SH) y de almacenamiento a temperaturas mayores de 5°C. Existen métodos que permiten distinguir entre la fosfatasa residual y la reactivada, eliminando así la incertidumbre de una mala pasteurización. ⁽¹⁾

Reactivación: Cuando un determinado producto después de pasteurizado da una reacción de fosfatasa alcalina negativa puede presentar, después de un cierto tiempo de almacenamiento, una reacción positiva (sobre todo la mantequilla). Se dice entonces que ha ocurrido una reactivación de la enzima. Esta reactivación se acelera cuando la leche se mantiene antes de la pasteurización en anaerobiosis, en condiciones reductoras con los tratamientos térmicos UHT o HTST y en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; por el contrario, esta reacción se retarda con un enfriamiento instantáneo y con temperaturas muy bajas de almacenamiento 2°C; puede evitarse añadiendo cobalto, cobre o níquel, así como con la ausencia de magnesio y de calcio. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que la prueba de la fosfatasa alcalina puede resultar positiva de nuevo (reactivación enzimática) en leche tratada térmicamente a través de dichos procesos y posteriormente a su almacenamiento. Debido a que la mayor parte de la enzima está en la membrana de los glóbulos grasos, el test de la

fosfatasa alcalina residual es menos sensible cuando se realiza sobre leche desnatada ^{(5), (42)}.

La prueba de la fosfatasa alcalina no resulta útil como indicador del tratamiento térmico en procesos de pasteurización a temperaturas altas, que cada vez se aplican con más frecuencia y es necesario considerar otras enzimas. La lactoperoxidasa ha sido utilizada para la leche tratada a 78°C durante 15 segundos como indicador en el comercio internacional. ⁽³⁸⁾

La prueba de la fosfatasa alcalina ha sido usada satisfactoriamente para detectar pasteurización inadecuada en leche y productos lácteos procesados por métodos convencionales a 62.8°C por 30 minutos, o 71.7°C por 15 segundos. Los productos sometidos a tratamientos térmicos de mayor calentamiento que las temperaturas convencionales (71.7°C) ya sea por tratamiento a Alta temperatura Corto Tiempo (HTST), Ultra pasteurización (UP), (UHT) (ver Cuadro N° 1), pueden dar un resultado negativo a la prueba de Fosfatasa alcalina residual inmediatamente después del calentamiento y el enfriamiento, y cuando se refrigeran a (4.4°C o menores). Sin embargo, se puede observar una prueba positiva en productos no almacenados adecuadamente, particularmente aquellos mantenidos a 10°C o más por prolongados periodos. El desarrollo de la restauración de la actividad de la fosfatasa alcalina ha sido definido como: Reactivación.

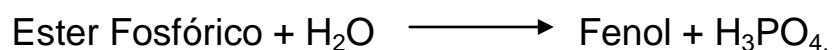
La ausencia de una alta población bacteriana en estos productos elimina la posibilidad de fosfatasa bacteriana.

La reactivación puede ocurrir en productos procesados a temperaturas superiores a los 100°C. La reactivación es mayor en productos procesados a 104.4°, incubados a 34°C, y ajustados a pH 6.5. Si se adicionan sales de magnesio a los productos procesados con tratamientos HTST o UP después del tratamiento calorífico pero antes de la incubación o almacenamiento, ellas catalizaran la reacción. Los productos con un alto contenido de grasa muestran un incremento de reactivación debido al alto contenido inicial de fosfatasa, pero un incremento en el tiempo de retención durante el calentamiento reduce la reactivación. La homogenización de los productos antes del proceso de calentamiento disminuye la reactivación. La reactivación de la fosfatasa alcalina es menor o no se presenta en productos con una acidez titulable de 0.40 a 0.45% (calculado como ácido láctico) o mayor.

La leche de vaca presenta variaciones en la concentración de fosfatasa alcalina y en su comportamiento de reactivación según la estación del año.

3.11.4 Actividad in vivo de la enzima Fosfatasa alcalina

El papel de la fosfatasa alcalina en la leche dentro de la vaca, es ayudar a reciclar el fosfato, un compuesto esencial. La fosfatasa alcalina está diseñada idealmente para esto, ya que solo es específica para el grupo ortofosfato y no importa cual sea el otro grupo. (1), (49).



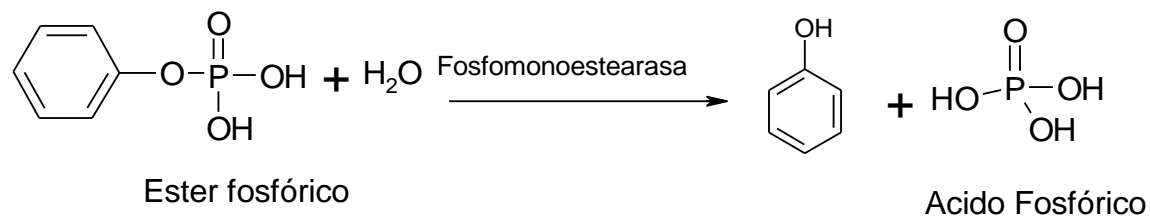


Fig. N° 3: Reacción de hidrólisis producida por la enzima Fosfatasa Alcalina sobre los esteres fosfóricos. ⁽¹⁸⁾

3.12 LACTOPEROXIDASA

3.12.1 Generalidades

La lactoperoxidasa fue la primera enzima que se descubrió en la leche. Es la enzima más abundante en la leche, después de la Xantina Oxidasa. Se encuentra en la leche de vaca en concentraciones aproximadas de 0.07 g/litro, lo que representa el 0.2% del total de las proteínas. Es una enzima que contiene un átomo de hierro por molécula, su pH óptimo es de 6.8. Resiste relativamente bien el calentamiento, para inactivarla es necesario calentar la leche por 30 segundos a 80 °C- 85 °C. ⁽³¹⁾

La lactoperoxidasa presenta como grupo prostético un grupo Hem, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los cianuros y la hidroxilamina, inhibiéndose su actividad enzimática.



Fig. N° 4. Sub unidad de una molécula de Lactoperoxidasa. (53)

La lactoperoxidasa es una proteína hémica que contiene un átomo de hierro por molécula. Parece ser diferente de la peroxidasa de los leucocitos. Resiste relativamente bien el calentamiento, pues es preciso mantener los 70°C durante 15 minutos o los 80 °C durante 30 segundos, para conseguir su destrucción. Se encuentra asociada con las proteínas del suero de la leche.

La concentración de lactoperoxidasa es baja en el calostro, aumenta hasta alcanzar el máximo a los cinco días después del parto, disminuyendo luego para permanecer, más o menos constante por todo el periodo de lactación.

La lactoperoxidasa pertenece al grupo de las oxidoreductasas y como tal cataliza las reacciones de oxidorreducción o de transferencia de electrones de un sitio de una molécula a otra.

Las reacciones oxidativas consisten generalmente en dos procesos sucesivos pero en presencia de iones halógenos y tiocianatos, los cuales reaccionan con el donador en una fase única, con transferencia de dos electrones, para obtener el donador oxidado y regenerar la enzima nativa.

3.12.2 Características de la Lactoperoxidasa

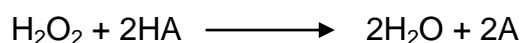
La peroxidasa está presente en la leche en cantidades variables y transfiere el oxígeno de los peróxidos. La enzima es termo resistente hasta 78°C y por ello se ha usado su ensayo, para comprobar si la leche se ha calentado a temperaturas más altas de las empleadas en la pasteurización normal. No obstante, algunas leches carecen, o contienen sólo cantidades muy pequeñas, de lactoperoxidasa. ⁽³⁵⁾

La lactoperoxidasa es una oxidorreductasa; transfiere oxígeno activo (atómico) de los peróxidos como el agua oxigenada, y es capaz de catalizar la oxidación de diversas sustancias con estructuras aromáticas: aminas aromáticas, fenoles, vitamina C, etc. El oxígeno atómico, es aceptado por una de estas sustancias presente en el medio. Por este motivo, puede ponerse de manifiesto en la leche añadiendo un poco de agua oxigenada y un cuerpo aceptador de oxígeno, que pueda actuar como indicador. Estas reacciones de oxidorreducción se han utilizado mucho para controlar la pasteurización alta de la leche; la enzima se destruye cuando la operación se ha realizado con eficacia. ⁽⁴⁴⁾

La enzima puede también catalizar la oxidación del tiocianato (NCS^-) por el H_2O_2 con la formación de un compuesto que inhibe el crecimiento de la mayoría

de las bacterias en la leche (por lo que su actividad biológica es la de ser una enzima antibiótica). Su actividad inhibidora de algunas bacterias lácticas la que la distingue de las peroxidasa vegetales. Cuando las propias bacterias producen H_2O_2 , como es el caso de casi todas las bacterias lácticas, resultan autoinhibidas. Su actividad antibacteriana es debido a la formación de oxitiocianato (hipotiocianato) ($OSCN^-$), que es un potente antimicrobiano. La leche contiene entre 0.017 y 0.25 mM de SCN^- . El sistema Lactoperoxidasa es activo contra gran variedad de bacterias Gram Positivas y Gram negativas incluyendo patógenos alimentarios, como ***Ps. fluorescens*** y ***Esch. Coli***, ***Campylobacter***, ***Escherichia***, ***Listeria***, ***Salmonella***. Por el contrario, se muestra inactiva frente a las esporas de géneros de ***Bacillus***. Las aplicaciones comerciales de esta enzima se basan en su potente actividad antimicrobiana para la conservación de distintos alimentos. (44), (45), (42)

La peroxidasa reduce los compuestos oxigenados, sustratos (HA), como se presenta en la reacción:



Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisan mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee también, la propiedad de regeneración enzimática. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado,

aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhídricos(-SH). La reactivación de la lactoperoxidasa también se asocia a la adición de cisteína y tiosulfato de sodio y en algunos casos la lactoperoxidasa es regenerada después de periodos largos de conservación de la leche. El proceso de reactivación también podría consistir en un proceso químico-coloidal, en el cual la caseína puede actuar como un coloide protector, siempre que el daño térmico no sea muy elevado. (47)

Se ha demostrado en el laboratorio que esta actividad enzimática puede detenerse totalmente, si el calentamiento es suficientemente largo, de manera que más de 30 segundos la regeneración es muy débil generalmente. A la temperatura de pasteurización, la lactoperoxidasa se inactiva, pero se regenera; en cambio, si la leche es sobrecalentada (a más de 80-85°C) la peroxidasa pierde su actividad en forma definitiva. (47)

3.12.3 Mecanismos de Inactivación de la Lactoperoxidasa:

La inactivación de la enzima a temperaturas de 87°C, se debe a la presencia de grupos -SH, generados durante el tratamiento calórico. (47)

La inactivación de lactoperoxidasa es mayor en leche no muy fresca y sin embargo la acidez de la leche no es causante de que la inactivación sea más intensa.

3.12.4 Actividad in vivo de la enzima Lactoperoxidasa

La enzima Lactoperoxidasa prácticamente como todas las peroxidasas son hemoproteínas (excepción notable es la glutatión peroxidasa, que es una selenoproteína) y tienen como sustrato común el H_2O_2 o peróxido de hidrógeno. La gran afinidad por este sustrato hace que se pueda unir al hierro del grupo hemo por los dos planos del centro activo, el superior y el inferior, dando lugar a una inhibición por exceso de sustrato ya que cuando ambas posiciones están ocupadas por el peróxido de hidrógeno no es posible la unión del otro sustrato.

Las peroxidasas son un tipo de enzimas muy extendidas en toda la escala filogenética. Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. En animales, existen peroxidasas con una función predominantemente defensiva en la saliva, la leche o los leucocitos, donde se aprovecha el carácter oxidante con fines germicidas y bactericidas el peróxido que se genera de forma endógena mediante otras reacciones (glucosa oxidasa, amino ácido oxidasa etc.). No todas las peroxidasas son defensivas, y por ejemplo una peroxidasa es también la responsable de la síntesis de las hormonas tiroideas, oxidando en este caso el yoduro a yodo para que éste se adicione a algunos de los anillos fenólicos de los residuos de tirosina de la tiroglobulina. Otras peroxidasas, como la glutatión

peroxidasa, están ampliamente distribuidas en diversos tejidos con fines diferentes, pero relacionados con una función antioxidante.

3.13 ESPECTROSCOPIA VISIBLE.

La espectroscopia visible se basa en la absorción y emisión de radiación, de los electrones en los átomos o moléculas. En el proceso de absorción, la radiación lleva a los electrones de un átomo o una molécula de un estado fundamental o basal a un estado de excitación de mayor energía, el proceso de emisión se lleva a cabo cuando esos electrones excitados regresan a niveles de energía inferiores y con ello emiten energía radiante proporcional a la frecuencia de la longitud de onda absorbida.

La espectrofotometría consiste en la medida de la absorción que experimentan las sustancias químicas, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, en la región visible (380 nm-780 nm). La espectrofotometría en la zona visible (que antes solía llamarse colorimetría) es muy adecuada para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias, constituye un medio útil adicional de identificación.

La cantidad absorbida por la solución de la muestra se relaciona con la concentración de sustancias que se desea analizar. Mientras más concentrada sea la solución de la sustancia analizada, mayor cantidad de luz es absorbida y se observa un color de tono más intenso, con esta finalidad se adiciona un reactivo a la muestra o a la sustancia puesta a prueba, para producir un color el

cual al ser comparado con la preparación estándar que ha realizado simultáneamente y que contiene aproximadamente una cantidad igual del estándar de referencia. (45).

En la región visible las longitudes de onda pueden ser apreciadas por el ojo, es decir la luz aparece en forma de color. (16), (18)

La medición de la luz en la región visible (colorimetría) puede realizarse espectrofotométricamente con la ayuda de un colorímetro fotoeléctrico, un espectrofotómetro o con menor precisión por comparación visual con estándares de color.

3.14 FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS INVESTIGADOS

3.14.1 METODOS PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL.

3.14.1.1 Método de Scharer.

Este ensayo se fundamenta en la acción de la enzima fosfatasa alcalina sobre el sustrato fenilfosfato disódico, con liberación de fenol y fosfato. La cantidad de fenol liberada a partir del sustrato es proporcional a la actividad de la enzima. El fenol es medido colorimétricamente después de su reacción con la 2,6 dicloroquinona clorimida (CQC) para formar: Indofenol, el cual es de color azul. El color se mide en unidades Scharer (una unidad es equivalente a 1 microgramo de fenol por mL)

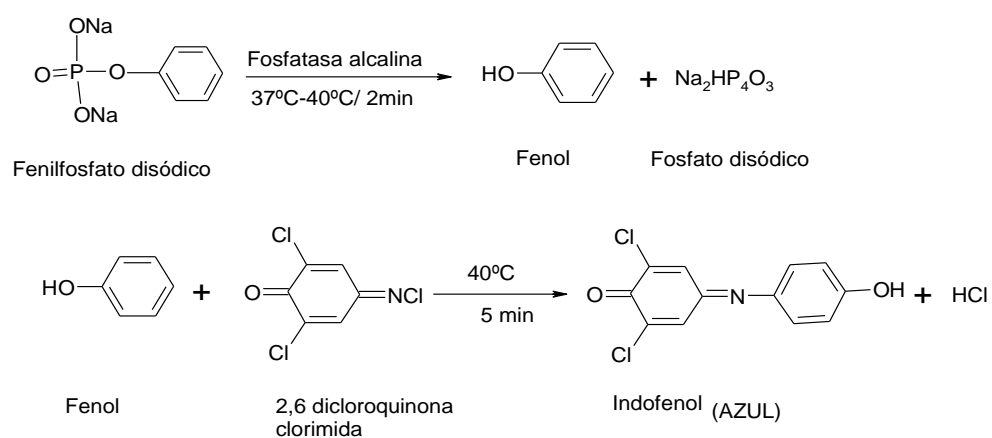


Fig.Nº 5: Reacción de Scharer para Fosfatasa alcalina.

3.14.1.2 Método de Cornell.

Este método presenta el mismo fundamento que el método rápido de Scharer (ver Fig. Nº 5) con la única variante de algunos reactivos.

3.14.1.3 Método de Sanders y Sager.

Este método se basa en la acción de la enzima Fosfatasa alcalina sobre el sustrato fenil fosfato disódico con liberación del fenol y el fosfato. La cantidad de fenol liberado se determina con la adición de 2,6 dibromoquinona clorimida (BQC) que produce un color azul en presencia de fenol. Siendo este último reactivo y las sustancias tamponadoras variantes del método de Scharer.

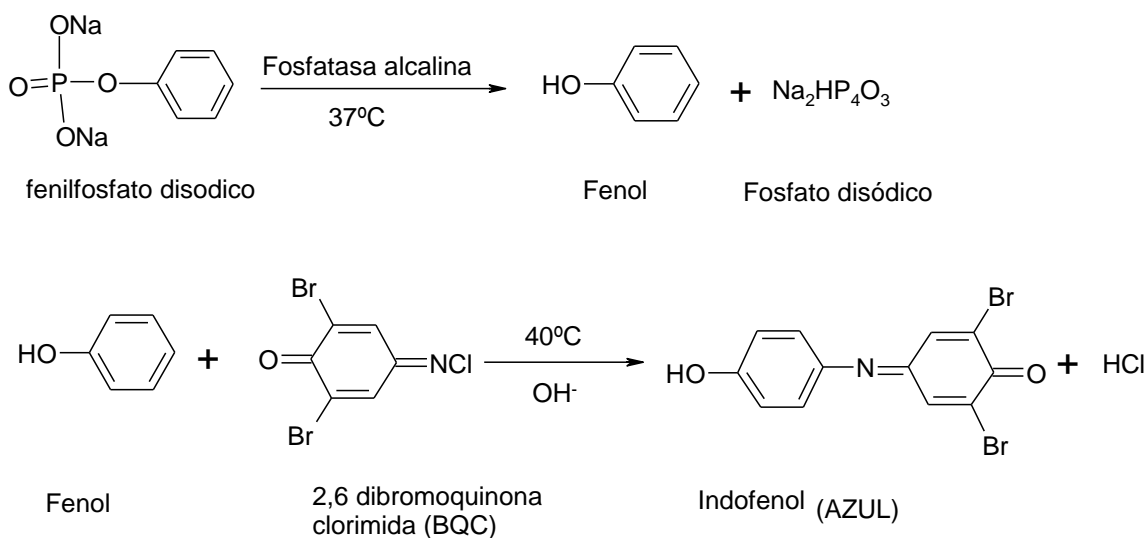


Fig. N° 6: Reacción de Sanders y Sager para Fosfatasa alcalina.

3.14.1.4 Método de Rutgers.

En 1970 Kleyn y Yen, recomendaron el uso de monofosfato de fenoltaleína como sustrato para determinar la presencia de fosfatasa alcalina en leche. (23)

Esta prueba es satisfactoria como una prueba indagatoria para estimar la actividad de fosfatasa alcalina en leches descremadas, leche y crema ligera. El fundamento de la prueba es que la fosfatasa alcalina puede hidrolizar el

monofosfato de fenoltaleina; la fenoltaleina es liberada y puede ser detectada por la adición de álcali. El color es comparado visualmente con un estándar preparado de la misma leche.

La enzima fosfatasa alcalina presente en la leche cruda libera fenoltaleina desde un sustrato de monofosfato de fenoltaleina cuando la prueba se lleva a cabo a la temperatura de 37°C y pH 10.15. La cantidad de fenoltaleina liberada del sustrato es proporcional a la actividad de la enzima. La fenoltaleina es detectada por adición de hidróxido de sodio [1N].

La prueba de la fosfatasa alcalina es aplicada a productos lácteos para determinar si la pasteurización se ha realizado adecuadamente y también para dictar la posible adición de leche cruda a la leche pasteurizada. La prueba es sencilla y es muy sensitiva a exposiciones menores que las establecidas para la pasteurización. El método puede emplearse juntamente con el método para diferenciar entre fosfatasa alcalina residual y fosfatasa alcalina reactivada. (13)

El método de Rutgers sirve para la determinación de fosfatasa alcalina residual según (AOAC). (29)

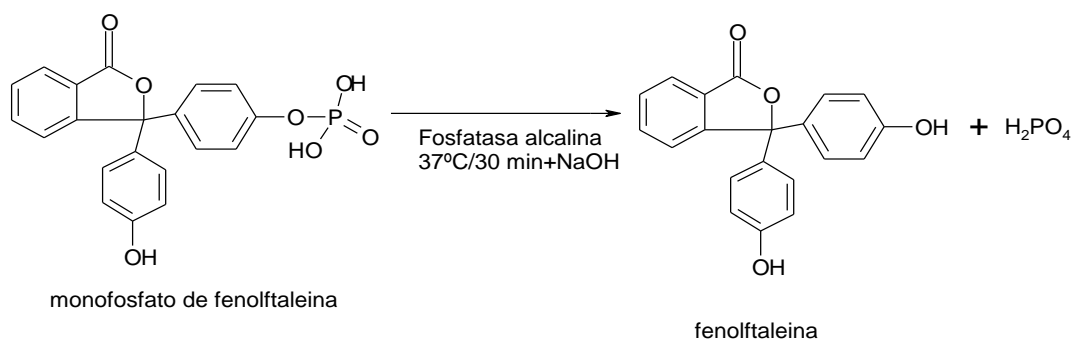


Fig. N° 7: Reacción de Rutgers para Fosfatasa alcalina.

3.14.1.5 Método de Aschaffenburg y Mullen.

Esta prueba se basa en la actividad de la fosfatasa alcalina presente en la leche cruda, sobre el sustrato p-nitrofenilfosfato disódico, en condiciones alcalinas liberando p-nitrofenol como producto, evidenciándose por su color amarillo.

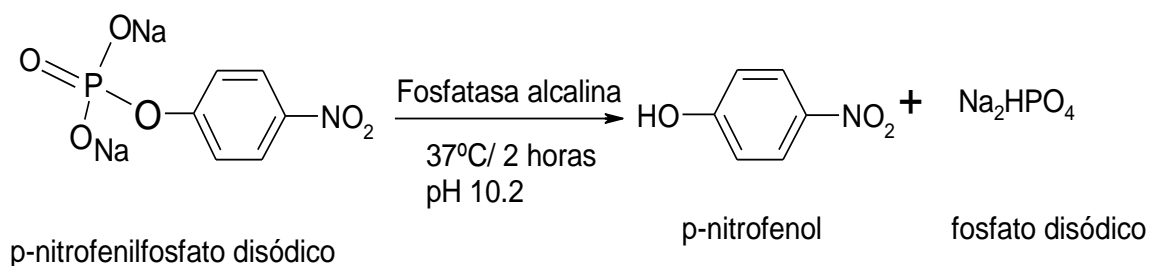


Fig. N° 8: Reacción de Aschaffenburg y Mullen.

3.14.1.6 Prueba para Fosfatasa con 4-Aminoantipirina

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina se basa en la hidrólisis enzimática, en medio alcalino, del fenilfosfato disódico a fenol y posterior determinación colorimétrica del fenol liberado con 4-aminoantipirina y ferrocianuro como agente oxidante. Este puede ser medido a 490 nm.

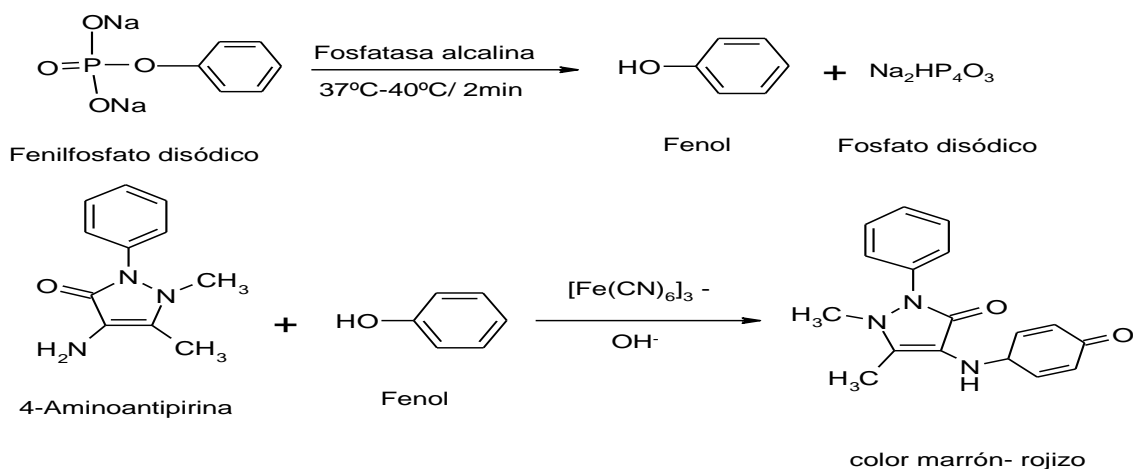


Fig. Nº 9: Reacción de Fosfatasa alcalina con 4-aminoantipirina.

3.14.1.7 Método Fluorimétrico

La actividad de la fosfatasa alcalina de la muestra se mide por un ensayo fluorimétrico cinético directo, continuo. Un sustrato de ester aromático, no fluorescente, monofosfórico, 2'-[2-benzotiazolil]-6'-fosfato hidroxibenzotiazole, en presencia de cualquier fosfatasa alcalina proveniente de la muestra, sufre una hidrólisis de su radical fosfato, produciendo un resultado de alta fluorescencia.

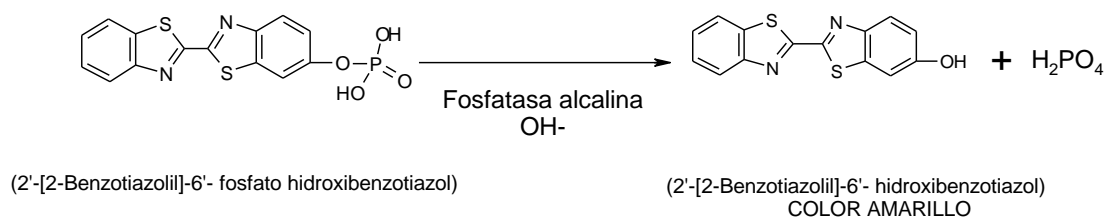


Fig. Nº 10: Reacción de Método Fluorimétrico para determinar fosfatasa alcalina.

3.14.1.8 METODO PARA FOSFATASA ALCALINA REACTIVADA.

Método para diferenciar Fosfatasa alcalina residual de Fosfatasa alcalina reactivada.

La diferencia entre fosfatasa alcalina reactivada y fosfatasa alcalina residual se basa en el hecho que la enzima puede ser residual en aquellos productos como la leche cruda o productos subpasteurizados y reactivada cuando la leche pasteurizada es tratada a temperaturas mayores que una pasteurización convencional.

Al almacenar una leche para el análisis con sales de magnesio a 34°C, esta presentará un incremento de 4 a 10 veces más su actividad fosfatasa en comparación con leche almacenada sin adicionar sales de magnesio. Para diferenciar entre fosfatasa residual y la reactivada, se debe comparar los resultados obtenidos al ensayar una dilución 1+5 de leche o producto lácteo conteniendo acetato de magnesio con los resultados del ensayo de porciones no diluidas de la misma muestra sin adicionar $Mg(C_2H_3O_2)_2$ después de almacenar a 34 °C por una hora.

Esta prueba es para descartar la presencia de fosfatasa alcalina debida a una reactivación o residual a un inefectivo tratamiento térmico, por lo que luego de este tratamiento es necesario llevar a cabo nuevamente la prueba de fosfatasa alcalina ya sea por el método de Rutgers, Cornell o cualquier otro método espectrofotométrico que pueda ser empleado.

3.14.2 METODOS PARA DETERMINAR LACTOPEROXIDASA

La lactoperoxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2).

3.14.2.1 Reacción de Dupoy

El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de lactoperoxidasa. Como fuente de peroxidasa la leche fresca de vaca (lactoperoxidasa, LPO) y como sustrato oxidable, el guayacol un metoxi-fenol cuyo producto de oxidación, tetraguayacol, es rojo salmón (anaranjado) y con suficiente estabilidad como para poder visualizarlo rápidamente. La estructura del tetraguayacol es compleja, y otras especies coloreadas derivadas del guayacol pueden también formarse en la reacción por mecanismos complejos donde participan radicales libres. La estequiometría de la reacción es:

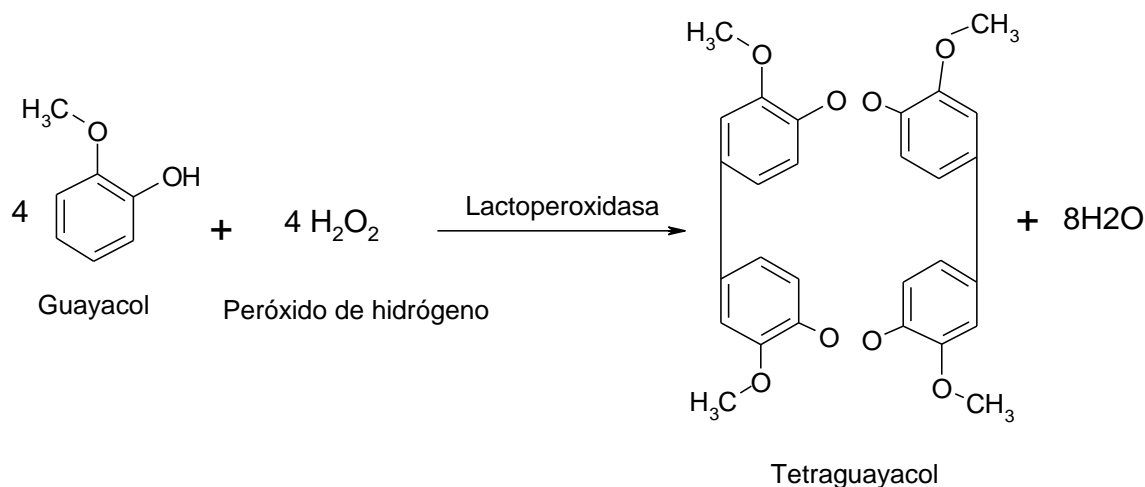


Fig. N° 11: Reacción de Dupoy para Lactoperoxidasa.

3.14.2.2 Método de Storch.

Con este método basado también en la oxidorreducción del sustrato parafenilendiamina por acción de la enzima Lactoperoxidasa en presencia del peróxido de hidrogeno produciendo una coloración azul oscuro como indicador de la oxidorreducción.

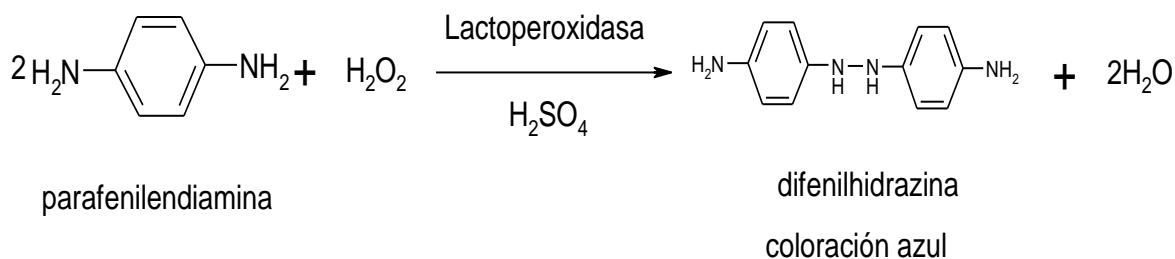


Fig. N° 12: Reacción de Storch para Lactoperoxidasa.

3.14.2.3 Método de Rothenfusser

Los métodos para determinar la concentración de lactoperoxidasa en la leche, se basan en la propiedad oxidante de la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno; la reacción se manifiesta colorimétricamente con la oxidación de los donadores de electrones: el guayacol y la para-fenilendiamina, en una mezcla de ellos, lo que constituye el reactivo de Rothenffuser.

3.14.2.4 Método ABTS

Este método es empleado para cuantificar lactoperoxidasa, como oxidorreductasa que cataliza la deshidrogenación de muchos compuestos orgánicos como fenol y aminas aromáticas, hidroquinonas, o-cresol, o-toluidina,

guayacol, pirogalol, p-fenilendiamina. Muchas de estas sustancias no son estables en solución y son consideradas como cancerígenas o peligrosas para la salud y el medio ambiente, por lo que recientemente se ha empleado un nuevo donador de electrones, el ABTS [Acido 2,2' -azino-di (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)].

El 2,2'- Azino -bis- (3- etil-benzotiazolina-6- ácido sulfónico) o ABTS es un compuesto que presenta gran estabilidad química, alta solubilidad en agua y un máximo de absorción en la banda del UVA a 342 nm. Este compuesto en presencia de H_2O_2 y enzimas peroxidadas deriva a un radical metaestable ($ABTS^+$) con un espectro de absorción característico y diferente al ABTS, presentando máximos de absorción en la región espectral del UV y visible a 413, 645, 727 y 811 nm.

El ABTS es un producto que presenta gran estabilidad en un amplio rango de pH, mostrando el mismo espectro de absorbancia a pH 4 y pH 8.5. Así mismo, la formación del radical $ABTS^+$ también se lleva a cabo en ese rango de pH pero la actividad enzimática de la lactoperoxidasa sí que es dependiente del pH del medio de reacción de manera que al alcalinizarse éste la actividad disminuye, aumentando así el periodo de retardo o "lag time". La actividad de la enzima se puede ajustar a una curva exponencial de manera que es máxima a pH 4.5 y deja de ser activa a pH superiores a 10.

La cuantificación de la capacidad de secuestro de radicales libres de una muestra se llevan a cabo mediante ensayos de decoloración en los cuales la

formación de $ABTS^+$ da lugar a una coloración característica que disminuirá de manera proporcional a la cantidad de sustancias con capacidad de atrapar estos radicales que se le añadan al volumen de reacción. Esta pérdida de color puede medirse mediante seguimientos cinéticos de pérdida de absorbancia a 413 nm (longitud de onda que no interfiere con otras moléculas) a lo largo de un minuto. (28)

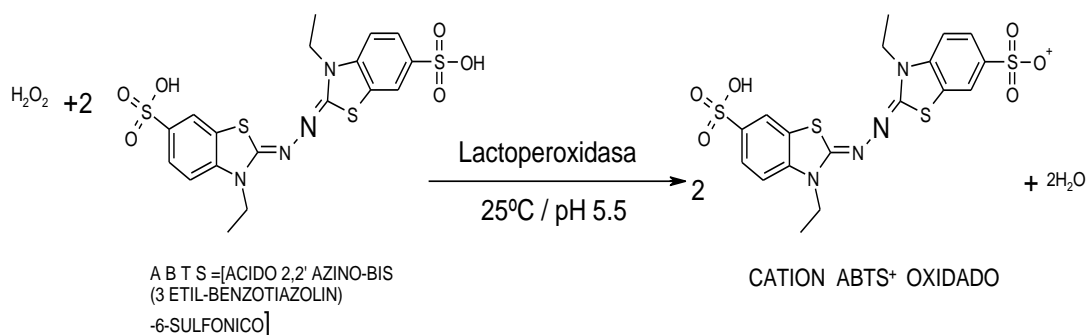
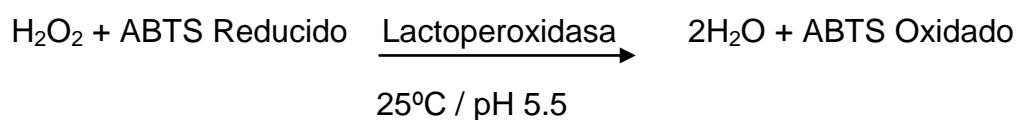


Fig. N° 13: Reacción ABTS para Lactoperoxidasa.

3.14.2.5 Reacción de Trinder.

El peróxido de hidrógeno reacciona con un cromógeno (fenol/4-aminoantipirina) por la reacción de Trinder, para dar una quinona que absorbe entre 492 y 550 nm. La intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de lactoperoxidasa. (Ver anexo N° 17).

Este método, propuesto por Trinder en 1972. Emplea como algunas sustancias reductoras (que ganan oxígeno) como la benzidina, o-toluidina, o-dianisidina. Sin embargo, la naturaleza carcinogénica de estos compuestos ha impulsado la búsqueda y a emplear otras sustancias reductoras alternativas. Uno de estos sistemas es la 4-aminoantipirina, que reacciona con el p-hidroxibencensulfonato y el peróxido de hidrógeno en presencia de lactoperoxidasa para formar un colorante quinonaimina con un máximo de absorción a 505 nm, de acuerdo al siguiente esquema de reacción.

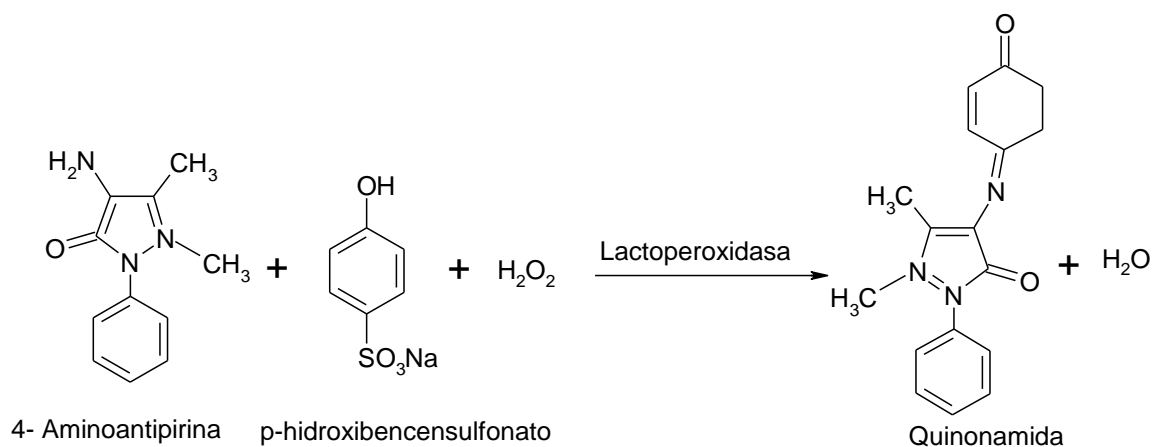


Fig. N° 14: Reacción de Trinder para Lactoperoxidasa.

3.15 PROCEDIMIENTOS DE LOS METODOS DE ANALISIS PARA DETERMINAR FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL, FOSFATASA ALCALINA REACTIVADA Y LACTOPEROXIDASA EN LACTEOS.

3.15.1 METODOS MAS CONOCIDOS PARA DETERMINAR FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL EN LACTEOS.

3.15.1.1 Prueba rápida para Fosfatasa alcalina por método de Scharer. (Método Cualitativo), AOAC. (13), (28), (29)

Aplicable a: Leche pasteurizada, crema agria, queso cottage, queso o mantequilla, leche condensada y leche en polvo.

A. Cristalería:

-Tubos de ensayo: deben tener una composición uniforme, paredes delgadas y de boro silicato. Un tamaño conveniente para los tubos es 12x144 mm calibrados a 5.0 mL - 5.5 mL y 8.5 mL hasta arriba del menisco; para la preparación de muestras de queso, usar tubos de ensayo de tamaño 18x150 mm.

-Pipetas morh de 1.0 mL y 5.0 mL, graduadas en divisiones de 0.1 mL.

-Pipetas volumétricas de 5.0 mL y 10.0 mL.

-Frascos volumétricos de 250.0, 500.0 y 1000.0 mL.

-Probeta de 25.0 y 100.0 mL

-Bureta de 50.0 mL

-Erlenmeyer de 150.0 mL

-Agitadores de vidrio

B. Equipo:

- Termómetro: graduado de 0 a 110°C.
- Balanza analítica y semianalítica.
- Fuente de luz y filtro: tal como una lámpara para observar rayos X dentales compuestas por una lámpara fluorescente de 14 a 22 watts tipo luz de día y un filtro de vidrio o plástico de aproximadamente 10 cm. de alto y 30 cm. de ancho; o un equipo adecuado y equivalente.

C. Materiales:

- Tapones para tubos de ensayo: libres de fenol.
- Frasco lavador.
- Gradilla para tubos de ensayo
- Baño de agua: con un control de termostato a 40 ± 1 °C.
- Baño de hielo.
- Parafilm.
- Frascos goteros: vidrio ámbar, tamaño ¼ oz. (7.5 mL), con gotero calibrado para dar aproximadamente 50 gotas de solución CQC por mililitro.
- Homogenizador manual o licuadora.

D. Reactivos:

1. Buffer: Disolver 100.0 g de sesquicarbonato de sodio dihidratado ($\text{NaHCO}_3 \cdot \text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o 46.86 g de carbonato de sodio más 37.17 g de bicarbonato de sodio en agua y llevar hasta un litro.

2. Buffer control: Diluir 25.0 mL del buffer anterior hasta 500.0 mL. Alternativamente, disolver una tableta de Buff-Fax en 50.0 mL de agua. Para la determinación en queso, crema agria, y mantequilla preparar un buffer control con una doble fuerza, diluir 25.0 mL de buffer hasta 250.0 mL; alternativamente, disolver una tableta de Buff-Fax en 25.0 mL de agua.
3. Buffer sustrato: Preferiblemente disolver 0.5 g de cristales de disodio fenil fosfato libre de fenol en agua, agregar 25.0 mL de buffer, y llevar hasta 500.0 mL con agua destilada. Opcionalmente preparar la solución disolviendo una tableta de Phos-Phax en 50.0 mL de agua. Para la determinación en queso, mantequilla, y crema agria, preparar un buffer sustrato con doble fuerza y preparar una solución para 250.0 mL; si se usa Phos-Phax para preparar el buffer sustrato de doble fuerza disolver una tableta Phos-Phax en 25.0 mL de agua.
4. Reactivo CQC: Disolver 30.0 mg de CQC cristalino en 10.0 mL de metanol o etanol. Opcionalmente preparar la solución disolviendo una tableta de Indo-Phax en 5.0 mL de metanol. Almacenar la solución bajo refrigeración y descartar después de una semana, o si se torna color café.
5. Catalizador: Disolver 200.0 mg de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 100.0 mL de agua. Al usar la tableta Indo-Phax, el catalizador puede ser omitido ya que las tabletas contienen la sal de cobre al igual que el CQC.
6. Alcohol *n*-butílico (neutralizado): Neutralizar el ácido libre en el alcohol de la siguiente manera: Adicionar 0.1 N NaOH al alcohol hasta que al ensayar una

pequeña cantidad con bromotimol azul hasta un viraje de color a verde o ligeramente azul. Para ensayar, mezclar una muestra del alcohol con una cantidad igual de agua destilada neutra, dejar que se separen las capas, y agregar unas cuantas gotas de solución indicador a la capa de agua. Alternativamente, adicionar 50.0 mL de buffer diluido (10.0 mL de buffer más 40.0 mL de agua destilada) por cada galón de alcohol (3.785 litros), mezclar bien, y almacenar en refrigeración.

7. *n*-Butanol, 7.5%: Adicionar 7.5 mL de butanol neutralizado a 92.5 mL de agua destilada.

E. Estándares:

1. Solución Madre Fenol: Pesar 1.000 g de fenol anhidro grado reactivo, transferir a un frasco volumétrico de un litro, aforar con solución de HCl 0.1N, y mezclar (1.0 mL contiene 1.0 mg de fenol). Esta solución madre se mantiene estable por varios meses en el refrigerador.
2. Soluciones diluidas de fenol:
 - a) Diluir 10.0 mL de la solución madre fenol hasta un litro con agua; cada mililitro contiene 10.0 µg de fenol.
 - b) Diluir 10.0 mL de la solución hasta 50.0 mL con agua. Preparar estas diluciones a diario; cada mililitro contiene 2.0 µg de fenol.
3. Estándares de Fenol:

Para una serie de tubos de ensayo similar a los que se usarán en el procedimiento de prueba de muestras, adicionar dilución de fenol y agua en

las cantidades especificadas (ver cuadro N° 2), las cuales deben ser preparadas recientemente.

Para el método rápido de Scharer, preparar solo las soluciones estándar de fenol que contienen 1.0, 2.0, y 5.0 µg de fenol por 5.0 mL de solución. Adicionar 0.5 mL de buffer, mezclar, y adicionar 6 gotas de reactivo CQC conteniendo el catalizador de cobre, o 2 gotas de solución catalizadora y 6 gotas de CQC para cada tubo. Mezclar inmediatamente e incubar por 5 min. a 40 °C en baño de agua.

4. Butanol- estándares extraídos: Extraer cada uno de los estándares con 3.0 mL de alcohol butílico. Después de separar el butanol, tomar una porción del alcohol butílico extraído y diluir con un volumen igual de butanol.

Las muestras en análisis, que han sido extraídas pero no diluidas, deberán ser comparadas directamente con estos extractos y estándares diluidos.

F. Controles:

1. Leche con chocolate, queso, helado, u otros productos saborizados: Realizar un control de sustancias interferentes en cada producto saborizado.
2. Crema mantequilla y queso: realizar un control de fosfatasa microbiana en cada muestra positiva.
3. Se realizará un control positivo para cada serie de muestras y un control negativo para cada clase de producto.

Cuadro N° 2: Preparación de Estándares de fenol para el método de Scharer.

Solución de Fenol (mL)	Agua (mL)	(μg de Fenol /mL)
-	5.0	0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
0.5	4.5	0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1.0	4.0	0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2.5	2.5	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
5.0	0.0	2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1.5	3.5	3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2.0	3.0	4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2.5	2.5	5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

G. Procedimiento:

1. Pipetear 0.5 mL o porciones de la muestra y controles en un tubo de ensayo adecuado.
 - a. Mantequilla, crema agria, y queso cremado cottage estarán mejor preparados para ser muestreados luego de ser homogenizados en una licuadora.
 - b. Queso o queso cottage seco: para ser muestreados, transferir 5.0 g a un tubo de ensayo (18x150 mm) conteniendo 2.0 mL de alcohol n- butílico 7.5% neutralizado y triturar con el agitador de vidrio. Agregar un exceso de 18.0 mL de alcohol n- butílico 7.5% neutralizado. Agitar bien, dejar macerar si es necesario por 30 minutos. A una porción de 0.5 mL de la muestra debe ser retirada de la parte más clara.
 - c. Mantequilla: para prepara las muestras, fundir la mantequilla a 40°C, mezclar, y pipetear una porción de 0.5 mL en el tubo de ensayo.

- d. Leche en polvo o concentrada: reconstituir el producto con agua hasta la concentración original de sólidos de leche y muestrear de la misma manera especificada para el producto original.
2. Cuando se ensaye leche, crema, helado, mantequilla, leche con chocolate o productos lácteos reconstituidos, agregar 5.0 mL de buffer sustrato. Cuando se ensaye mantequilla, crema agria, queso o queso cottage, agregar 5.0 mL de buffer sustrato preparado con doble fuerza buffer. Para resultados fiables, el pH de la mezcla deberá ser probado y ajustado, si es necesario, a pH 9.5 a 10 con buffer carbonato. Mantener las muestras frías antes de la prueba.
3. Tapar los tubos y mezclar invirtiendo varias veces.
4. Colocar los tubos en el baño de agua, calentado a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, y luego incubar los tubos a $40^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.
5. Remover los tubos del baño de agua, agregar a cada tubo 6 gotas de reactivo CQC conteniendo catalizador (agregar 2 gotas de catalizador si el CQC no contiene sulfato de cobre. Tapar, mezclar, y reincubar por 5 minutos.
6. Remover los tubos del baño de agua, enfriar en un baño de agua con hielo, agregar a cada tubo 3.0 mL de alcohol *n*-butílico neutralizado frío, y extraer el indofenol azul invirtiendo los tubos suavemente cuatro veces haciendo un medio círculo al agitarlos (tomar cerca de 2 segundos para invertir los tubos, detenerse por 2 segundos y, tomar otros 2 segundos para regresar el tubo a la posición recta, detenerse por 2 segundos y luego repetir). Poner los tubos

de lado sobre una superficie recta por 2 minutos para permitir la separación del butanol, luego repetir los pasos de mezclado y separación.

7. Si todo el butanol ha sido emulsificado y no se observan restos de la capa de butanol, enfriar los tubos por 5 minutos en baño de agua con hielo y luego centrifugar por 5 minutos.
8. Mantener los tubos erectos y comparar los colores de las capas de butanol con los estándares. La comparación de colores debe hacerse usando una luz estándar. (Ver anexo N° 5)

Cuadro N° 3: Adición de Reactivos en el método de Scharer.

Reactivos	Tubo Muestra
Muestra	0.5 mL
Buffer sustrato	5.0 mL
CQC	6 gotas (0.3 mL)
Catalizador	2 gotas (0.1 mL)
Alcohol n- butílico	3.0 mL

H. Interpretación:

Únicamente 0.5 mL de leche o producto lácteo se ensaya, pero la dilución de los estándares 1:1 es equivalente a multiplicar por 2 o convertir para 1.0 mL; por lo que el valor corresponde a microgramos de fenol por mililitro de producto. Un valor de 1.0 µg o más de fenol por mililitro de leche, producto lácteo, producto lácteo reconstituido o extracto de queso indica una pasteurización inadecuada o una contaminación con producto sin pasteurizar.

3.15.1.2 Método Espectrofotométrico modificado para Fosfatasa Alcalina. (Método Cuantitativo), AOAC ⁽²⁸⁾, ⁽²⁹⁾.

Aplicable a: Leche pasteurizada, crema, leche saborizada con chocolate, helado, crema agria, queso cottage, queso, mantequilla, leche condensada y leche en polvo.

Este es una modificación del método rápido de Scharer, y las muestras de varios productos deben ser preparadas para la prueba como se describe en el método de Scharer.

A. Cristalería:

- Tubos de ensayo: vidrio boro silicato, 16×125 mm o 16×150 mm con tapones de vidrio.
- Pipetas morh de 1.0 mL y 5.0 mL, graduadas en divisiones de 0.1 mL.
- Pipetas volumétricas de 5.0 mL y 10.0 mL.
- Frascos volumétricos de 250.0, 500.0 y 1000.0 mL.
- Probeta de 25.0 y 100.0 mL
- Bureta de 50.0 mL
- Erlenmeyer 150.0 mL
- Agitadores de vidrio.
- Celdas adecuadas, redondas, 12×75 mm.

B. Equipo:

- Termómetro: graduado de 0 a 100°C.
- Balanza analítica y semianalítica

-Centrifuga: que pueda sostener seis tubos de 15.0 mL en un ángulo fijo, o alguna centrifuga donde se coloquen para centrifugar tubos cerrados de 16x150 mm.

-Espectrofotómetro o colorímetro.

C. Materiales:

-Tapones de goma, libres de fenol o tapones de vidrio.

-Gradilla para tubos de ensayo

-Baño de agua con un control de termostato a 40 ± 1 °C.

-Baño de hielo.

-Frasco lavador.

-Parafilm.

-Baño de agua con un control de termostato a 40 ± 1 °C.

-Frascos goteros: vidrio ámbar, tamaño ¼ oz. (7.5 mL), con gotero calibrado para dar aproximadamente 50 gotas de solución CQC por mililitro.

D. Reactivos:

1. Buffer: Disolver 100.0 g de sesquicarbonato de sodio dihidratado ($\text{NaHCO}_3 \cdot \text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ó 46.86 g de carbonato de sodio más 37.17 g de bicarbonato de sodio en agua y llevar hasta un litro.
2. Buffer control: Diluir 25.0 mL del buffer anterior hasta 500.0 mL. Alternativamente, disolver una tableta de Buff-Fax en 50.0 mL de agua. Para la determinación en queso, crema agria, y mantequilla preparar un buffer

control con una doble fuerza, diluir 25.0 mL de buffer hasta 250.0 mL; alternativamente, disolver una tableta de Buff-Fax en 25.0 mL de agua.

3. Buffer sustrato: Preferiblemente disolver 0.5 g de cristales de disodiofenil fosfato libre de fenol en agua, agregar 25.0 mL de buffer, y llevar hasta 500.0 mL con agua destilada. Opcionalmente preparar la solución disolviendo una tableta de Phos-Phax en 50.0 mL de agua. Para la determinación en queso, mantequilla, y crema agria, preparar un buffer sustrato con doble fuerza y preparar una solución para 250.0 mL; si se usa Phos-Phax para preparar el buffer sustrato de doble fuerza disolver una tableta Phos-Phax en 25.0 mL de agua.
4. Reactivo CQC: Disolver 30.0 mg de CQC cristalino en 10.0 mL de metanol o etanol. Opcionalmente preparar la solución disolviendo una tableta de Indo-Phax en 5.0 mL de metanol. Almacenar la solución bajo refrigeración y descartar después de una semana, o si se torna color café.
5. Catalizador: Disolver 200.0 mg de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 100.0 mL de agua. Al usar la tableta Indo-Phax, el catalizador puede ser omitido ya que las tabletas contienen la sal de cobre al igual que el CQC.
6. Alcohol *n*-butílico (neutralizado): Neutralizar el ácido libre en el alcohol de la siguiente manera: Adicionar 0.1N NaOH al alcohol hasta que al ensayar una pequeña cantidad con bromotimol azul hasta un viraje de color a verde o ligeramente azul. Para ensayar, mezclar una muestra del alcohol con una cantidad igual de agua destilada neutra, dejar que se separen las capas, y

agregar unas cuantas gotas de solución indicador a la capa de agua. Alternativamente, adicionar 50.0 mL de buffer diluido (10.0 mL de buffer más 40.0 mL de agua destilada) por cada galón de alcohol (3.785 litros), mezclar bien, y almacenar en refrigeración.

7. *n*-Butanol, 7.5%: Adicionar 7.5 mL de butanol neutralizado a 92.5 mL de agua destilada.

E. Estándares:

1. Solución Madre Fenol: Preparar de la misma manera que para el método rápido de Scharer. (Ver Pág. 88)
2. Soluciones diluidas de fenol: Preparar de la misma manera que para el método rápido de Scharer. (Ver Pág. 88)
3. Estándares de Fenol: Prepara de la misma manera que para el método rápido de Scharer. (Ver Pág. 88-89)

Para la construcción de la curva de Estándar, prepare solo estándares conteniendo 0.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 μg de fenol por 5.0 mL de solución (Ver cuadro N° 2). Adicionar 0.5 mL de Buffer, mezclar, y agregar 6 gotas de reactivo CQC que contenga catalizador de cobre o 2 gotas de catalizador y 6 gotas de reactivo CQC para cada estándar. Mezclar inmediatamente e incubar por 5 minutos a 40 °C en baño de agua.

4. Extracción con alcohol *n*- butílico: Adicionar 5.0 mL de alcohol *n*- butílico para cada uno de los estándares preparados. Extraer el azul de indofenol

siguiendo el procedimiento dado para el método rápido de Scharer, y centrifugar por 5 minutos.

5. Construcción de la curva estándar:

- a. Retirar 2.0 mL de la capa de alcohol butílico de cada estándar extractado y diluir con un volumen igual de butanol en una beaker adecuado, mezclar y llenar la celda.
- b. Para calibrar el espectrofotómetro se lleva a cero absorbancia (100% T) con el blanco a una longitud de onda de 650 nm posteriormente se lee el valor de la absorbancia de cada estándar.
- c. Plotear las lecturas de absorbancia versus los microgramos de fenol en los estándares. Y trazar la mejor línea entre los puntos de 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 μ L de fenol por 5.0 mL de estándar preparado.

F. Controles: Realizar los mismos controles que para el método rápido de Scharer. (Ver Pág. 89)

G. Procedimiento:

Las muestras para ensayar varios productos deben prepararse como se indica para el método rápido de Scharer. (Ver Pág. 90)

1. Pipetear 0.5 mL de muestra bien mezclada en un tubo de ensayo de 16x125 mm conteniendo 5.0 mL de buffer sustrato. Tapar con un tapón de goma libre de fenol y mezclar por inmersión.

2. Incubar la mezcla en análisis, juntamente con un control negativo preparado similarmente del mismo tipo de muestra, a 40 ± 1 °C por una hora, en baño de agua.
3. Remover las muestras del baño de agua, y agregar 6 gotas de reactivo CQC (conteniendo catalizador) para cada uno de los tubos, mezclar y reincubar por 5 minutos.
4. Remover las muestras del baño de agua, enfriar en baño de agua con hielo por 5 minutos, agregar 5.0 mL de butanol frío, y mezclar por inmersión.
5. Centrifugar las muestras por 5 minutos y pipetear 3.0 mL de la capa de alcohol butílico de cada muestra en un vaso de precipitado de 5.0 mL.
6. Llevar a cero el espectrofotómetro con el control negativo y leer el valor de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 650 nm.

(Ver Anexo N° 6)

H. Interpretación:

Identificar la concentración de fenol en la muestra por comparación de la absorbancia leída de la muestra en la curva estándar. Los resultados así obtenidos muestran los microgramos de fenol por mililitro directamente. Sólo 0.5 mL de la muestra se usan en la prueba pero los estándares fueron diluidos 1:1 y el resultado neto es equivalente a multiplicar por 2 o convertir a un mililitro de muestra. Cualquier valor mayor que 2.3 µg de fenol por mililitro es indicativo de pasteurización impropia.

3.15.1.3 Método de Cornell para Fosfatasa alcalina.

(Método Cuantitativo) ⁽¹²⁾.

Aplicable a: Leche pasteurizada, crema, leches saborizadas, queso cottage, queso, queso crema o mantequilla, leche condensada y leche en polvo.

A. Cristalería:

- Tubos de ensayo: Vidrio de borosilicato, 16×150 mm.
- Pipetas morh de 1.0 mL y 5.0 mL (o 10.0 mL).
- Frascos volumétricos 1000.0 mL
- Probeta 100.0 mL
- Pipeta volumétrica de 1.0 mL
- Beaker 50.0 mL y 100.0 mL
- Embudo: Tamaño adecuado para papel filtro de 11 cm.

B. Equipo:

- Termómetro: 0 a 110°C.
- Espectrofotómetro o colorímetro.
- Balanza analítica: precisión 5.0 mg.

C. Materiales:

- Baño de agua: a temperatura termostáticamente controlada de 37±1 °C.
- Papel filtro: Whatman N° 42, 11 cm.
- Frascos goteros ámbar: con capacidad para 25.0 a 50.0 mL.
- Fuente de luz.
- Parafilm.

D. Reactivos:

1. Buffer Sustrato Carbonato: Disolver 11.5 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3), 10.2 g de bicarbonato de sodio anhidro (NaHCO_3), y 1.1 g de fenil fosfato disódico, en agua destilada y llevar hasta un litro.
2. Precipitante Acido clorhídrico-Tricloroacético: Disolver 25.0 g de cristales de ácido tricloroacético en 50.0 mL de agua, agregar 50.0 mL de acido clorhídrico concentrado (36 % aproximadamente), y mezclar completamente.
3. Solución de carbonato de sodio, 8%: Disolver 80.0 g de carbonato de sodio anhidro en agua destilada y llevar a 1 litro.
4. Solución de sulfato de cobre- hexametafosfato de sodio: Disolver 0.5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 50.0 g de cristales de hexametafosfato de sodio, en agua destilada y llevar a un litro.
5. Solución CQC: disolver 0.2 g de 2,6 dicloroquinona clorimida (CQC) cristalino en 25.0 mL de metanol o etanol absoluto. (Ver Anexo N° 3)
6. Alcohol *n*- butílico: punto de ebullición 117.5 °C, no neutralizado.

E. Estándares de fenol coloreados:

1. Solución madre de fenol: disolver 1.0 g de cristales de fenol en agua y llevar a 1 L. Mantener en refrigeración antes y después de usar, sino es de preparación recientemente.
2. Solución buffer: disolver 11.5 g de carbonato de sodio anhidro (NaCO_3), 10.2 g de bicarbonato de sodio anhidro (NaHCO_3), y 0.1 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y llevar hasta un litro.

3. Solución fenólica diluida: adicionar para 2.0 mL de solución madre de fenol suficiente solución buffer para hacer 500.0 mL. Esta solución contiene 4.0 µg de fenol por mililitro de solución. Preparar a diario.
4. Soluciones estándar y desarrollo final: pipetear en cada tubo de ensayo (16x150 mm) alícuotas en las proporciones indicadas en las primeras dos columnas del cuadro N° 4, a uno de los cuales se realiza un ajuste posterior para que antes del desarrollo del color, todos los tubos tengan 10.0 mL de volumen.

Adicionar a cada una de los tubos con 10.0 mL de volumen, exactamente 2 gotas de CQC con una rápida agitación e invierta el tubo una vez. Incubar a 37 °C por 5 minutos para desarrollo del color. Adicionar 5.0 mL de alcohol n-butílico a cada uno de los tubos. Invertir el tubo cinco veces para extraer el color. Sellar los tapones con un cierre adecuado y guardar en el refrigerador o en baño de agua con hielo.

5. Construcción de la curva estándar:

Remover aproximadamente 3.0 mL de alcohol de los estándares extractados con una pipeta en celdas limpias y pequeñas o en los tubos del colorímetro. Leer contra los extractos de butanol desde la solución estándar de fenol 0.0 µg/mL usando un colorímetro o un espectrofotómetro fijado a una absorbancia 0 (100% transmitancia) y a una longitud de onda de 650 nm. Plotear en papel milimetrado los valores de absorbancia o de densidad óptica

versus las concentraciones de fenol empleadas. Trazar la línea a través de los puntos y usar la curva de estándares.

Cuadro N° 4: Estándares de fenol coloreados para el método de Cornell.

Solución Buffer (mL)	Solución diluida de fenol (mL)	µg de Fenol por tubo
10.0	0.0	0.0 µg/mL
15.6	0.4**	0.16 µg/mL
9.5	0.5	0.2 µg/mL
9.0	1.0	0.4 µg/mL
8.0	2.0	0.8 µg/mL
7.0	3.0	1.2 µg/mL
6.0	4.0	1.6 µg/mL
5.0	5.0	2.0 µg/mL
0.0	10.0	4.0 µg/mL

*Mezclar las primeras dos columnas para obtener la concentración respectiva de fenol.

** Remover 6.0 mL de la mezcla y descartar. El desarrollo del color se hará en los restantes 10.0 mL de solución.

F. Controles:

Los controles en leche saborizada con chocolate, helado, y leches saborizadas positivos y negativos, al proporcionar altos valores en los controles negativos, indica presencia de sustancias interferentes. Por lo cual dichos valores deben restarse como se plasma en la interpretación de resultados (ver pág.104)

G. Procedimiento

1. Preparación de la muestra: Para leche, crema, leche saborizada con chocolate, mantequilla, suero, mezcla de helado, leche condensada. Pipetear

1.0 mL de producto en un tubo de ensayo, adicionar 10.0 mL de buffer sustrato carbonato calentado a 37°C, y agitar. Para queso maduro, cottage o queso crema, mantequilla o leche en polvo: Transferir 0.5 g de producto a un tubo de ensayo. Adicionar 1.0 mL de buffer sustrato carbonato calentado a 37°C y macerar el sólido en forma de pasta o en pequeños partículas con el agitador de vidrio. Luego adicionar 9.0 mL adicionales de buffer sustrato carbonatado y agitar.

2. Incubación: Colocar los tubos de ensayo en el baño de agua a 37°C de temperatura. Dejar los tubos por 5 minutos en el baño de agua hasta que alcancen los 37°C y entonces incubar por una hora.

3. Precipitación: Después de incubar, remover los tubos de ensayo y adicionar con la pipeta cuidadosamente por las paredes del tubo 1.0 mL de precipitante ácido clorhídrico-tricloroacético.

Filtrar después de algunos segundos sobre un tubo de ensayo limpio (16x150 mm), previamente calibrado a intervalos de 5.0 mL.

4. Desarrollo y medición del color: A 5.0 mL del filtrado claro adicionar 1.0 mL de solución de sulfato de cobre- hexametáfosfato de sodio. Pipetear dentro del tubo 5.0 mL de Solución calentada de carbonato de sodio (8%) y mezclar. Adicionar exactamente 2 gotas de solución CQC y rápidamente invertir el tubo una vez. Permitir que se desarrolle el color a 37°C por exactamente 5 minutos. Adicionar 5.0 mL de alcohol n-butílico, invertir el tubo cinco veces, y

dejar reposar por un minuto. Comparar los colores azules visualmente contra los estándares de alcohol, leer en espectrofotómetro.

Opcionalmente, en lugar de una lectura visual, remover aproximadamente 3.0 mL de solución de alcohol butílico extractado de cada tubo de ensayo con una pipeta limpia transferir a una celda limpia o a un tubo del colorímetro con un diámetro de 12 mm, colocar en el colorímetro, y medir la absorbancia o la densidad óptica a 650 nm contra un filtrado de alcohol extractado de un control negativo, ajustar a 100% transmitancia. Determinar la concentración de fenol por referencia a la curva de estándares preparada. (Ver Anexo N° 7)

Cuadro N° 5: Adición de Reactivos en el Método de Cornell.

Reactivo	Tubo Muestra
Muestra	1.0 mL
Buffer Sustrato Carbonato	10.0 mL
HCl/ ácido tricloroacético	1.0 mL
Cu ₂ SO ₄ / Hexametafosfato	1.0 mL
Carbonato de Sodio 8%	5.0 mL
Solución CQC	2 gotas
Alcohol n- butílico	5.0 mL

H. Interpretación: Expresar los valores directamente, sin usar factor de multiplicación de ningún tipo. Cualquier valor mayor de 1.0 µg de fenol por mL de leche u otro producto lácteo fluido, o por 0.25 g de queso u otro producto lácteo sólido indica una subpasteurización, o recontaminación con leche cruda, o ambos. Las cantidades de leche y queso, mencionadas en esta interpretación se derivan del volumen de filtrado analizado, el cual representa aproximadamente la mitad de volumen o peso original de la muestra.

3.15.1.4 Método de Rutgers para Fosfatasa alcalina residual.

(Método Cualitativo), AOAC (12), (28), (29).

Aplicable a: Leche pasteurizada, crema ligera (Light), leche semidescremada, queso, helado, mantequilla, leche condensada y leche en polvo.

Ensayo para estimar fosfatasa en leche descremada, leche y crema ligera.

A. Cristalería:

-Tubos de ensayo: composición uniforme, paredes delgadas, y de boro. Tubos con dimensiones 15×100 mm.

-Pipetas: graduadas o volumétricas, 1.0 mL.

-Frascos volumétricos 100.0 mL, 1000.0 mL

-Pipeta volumétrica de 1.0 mL

-Probeta de 25.0 mL

-Beaker 50.0 mL, 100.0 mL

B. Equipo:

-Balanza analítica y semianalítica

-pHmetro

C. Materiales:

-Baño de Agua con termostato, ajustado hasta $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C.

-Papel Parafilm.

D. Reactivos:

1. Sustrato concentrado: Disolver 3.9 g de dicitclohexilamina sal de monofosfato de fenolftaleina y 73.2 g de 2-amino-2-metil-1-propanol en 21.9 mL de acido clorhídrico. El pH es de 10.15 a 25 °C.
2. Estándar Concentrado: Disolver 10.0 mg de fenolftaleina, 40.0 mg de tartrazina y 73.2 g de 2-amino-2-metil-1-propanol en 21.9 mL de acido clorhídrico. El pH es de 10.15 a 25 °C.
3. Desarrollador del color: Disolver 10.0 g de Hidróxido de sodio en agua libre de CO₂ y diluir a 100.0 mL.
4. Alcohol n-butílico, 7.5%: Ajustar 75.0 mL de alcohol n-butílico a pH 7 adicionando NaOH 1 N y llevar hasta 1 litro.

Todos los reactivos son estables indefinidamente en refrigeración.

E. Procedimiento:

El procedimiento actualmente se limita a leche descremada, leche y crema ligera por la AOAC. Aunque no oficialmente, el método es aplicable a leche baja en grasa, crema espesa, queso, mantequilla, leche concentrada y en polvo. También, el método puede ser usado juntamente con el método para diferenciar entre fosfatasa alcalina residual y reactivada.

1. Pipetear porciones de 1.0 mL de muestra en dos tubos de ensayo.
 - a. Queso: Colocar 5.0 g de queso en un tubo de ensayo (18x150 mm) y agregar 20.0 mL de alcohol n-butílico 7.5 % neutralizado. Triturar la muestra con un

- agitador de vidrio por 2 minutos y filtrar inmediatamente a través de papel filtro Whatman N° 4. Usar 1.0 mL de filtrado para realizar la prueba.
- b. Mantequilla: Fundir la muestra a 40 °C, mezclar, y usar una porción de 1.0 mL para la prueba.
- c. Leche concentrada y en polvo: Reconstituir con agua a la concentración original de sólidos. Mezclar y usar porciones de 1.0 mL para la prueba.
2. Colocar los tubos en el baño de agua y calentar hasta $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C.
 3. Agregar 1 gota (0.05 mL) de sustrato concentrado a un tubo y agregar a otro tubo una gota (0.05 mL) de estándar concentrado.
 4. Agitar e incubar a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C por 30 minutos.
 5. Agregar 1 gota (0.05 mL) de revelador de color a cada tubo, agitar y comparar visualmente. (Ver anexo N° 8)

Cuadro N° 6: Adición de Reactivos en el Método de Rutgers.

Reactivo	Tubo Muestra	Tubo Estándar
Muestra	1.0 mL	1.0 mL
Sustrato concentrado	1 gota (0.05 mL)	-----
Estándar concentrado	-----	1 gota (0.05 mL)
Solución reveladora del color	1 gota (0.05 mL)	1 gota (0.05 mL)

F. Interpretación:

Si el tubo conteniendo sustrato concentrado muestra una coloración rosada menor que la del tubo conteniendo estándar concentrado, la muestra puede ser considerada adecuadamente pasteurizada. El estándar debe contener 4.0 µg de fenolftaleína por tubo lo cual es igual a la cantidad de fenolftaleína liberada

en 30 minutos por 1.0 mL de leche pasteurizada contaminada con 0.1 % de leche cruda. La preparación de un estándar de la misma leche muestreada, resulta muy importante en la comparación visual, para conocer si las coloraciones tienen la misma tonalidad.

3.15.1.5 Método de Aschaffenburg y Mullen.

(Método Cualitativo) ⁽²⁴⁾.

Aplicable a: Leche entera, extracremosa, semidescremada o descremada pasteurizadas fluidas o en polvo, crema; mantequilla.

A. Cristalería:

-Celdas de 25 mm cada una.

B. Equipo:

-Balanza analítica.

-Comparador colorimétrico con disco especial, conteniendo cristales de color patrones calibrados en microgramos de p-nitrofenol por mL de leche.

C. Materiales:

-Baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, controlado por termostato.

D. Reactivos.

-Solución tampón de carbonato de sodio y de bicarbonato de sodio: Para preparar esta solución tampón disolver 3.5 g de carbonato de sodio anhidro y 1.5 g de bicarbonato de sodio en agua y diluir hasta 1000.0 mL en un frasco volumétrico.

-Sustrato en solución tampón: Para prepara esta solución tampón disolver 1.5 g de p-nitrofenilfosfato disódico con solución tampón de carbonato de sodio - bicarbonato de sodio y diluir hasta 1000.0 mL en un frasco volumétrico.

Esta solución se mantiene estable durante un mes en el refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ pero habrá que efectuar antes de usarlas un test de control del color en las soluciones almacenadas de esta forma.

-Precipitantes:

-Sulfato de zinc.

Disolver 30.0 g de sulfato de zinc (ZnSO_4) en agua y completar hasta 100.0 mL en frasco volumétrico.

-Hexacianoferrato (II) de potasio en solución.

Disolver 17.2 g de hexacianoferrato (II) de potasio trihidrato [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] en agua y aforar a 100.0 mL en un frasco volumétrico.

E. Procedimiento.

-Preparación de la muestra.

Disolver 10.0 g de polvo en 90.0 mL de agua. La temperatura de disolución no ha de exceder los 35°C .

-Determinación:

Pipetear 15.0 mL de sustrato en solución tampón en un tubo de ensayo limpio y seco, luego 2.0 mL de la muestra de leche a analizar. Cerrar el tubo con un tapón, mezclar dando vueltas al tubo y colocar en baño de agua a 37°C .

Colocar simultáneamente en el baño de agua un tubo de control conteniendo 15.0 mL de sustrato en solución tampón y 2.0 mL de muestra de leche hervida del mismo tipo que la del análisis.

Sacar los tubos del baño de agua al cabo de dos horas, añadir 0.5 mL de precipitante de sulfato de zinc, colocar de nuevo el tapón y agitar vigorosamente. Dejar reposar durante tres minutos.

Añadir 0.5 mL de precipitante de hexacianoferrato (II) de potasio; mezclar por completo y filtrar en papel filtro plegado; recoger el líquido filtrado en un tubo de análisis limpio.

Trasladar el líquido filtrado a una celda de 25 mm y comparar con respecto al líquido filtrado de la muestra de control hervida en el colorímetro, utilizando el disco especial. Y contra una celda conteniendo agua destilada que será el blanco, y realizar las lecturas de la densidad óptica. (Ver Anexo N° 9)

Cuadro N° 7: Adición de Reactivos en el Método de Aschaffenburg y Mullen.

Reactivo	Tubo Muestra	Tubo Control Negativo
Sustrato tamponado	15.0 mL	15.0 mL
Muestra	2.0 mL	2.0 mL (muestra hervida)
Precipitante Zn SO ₄	0.5 mL	0.5 mL
Precipitante [K ₄ Fe (CN) ₆ ·3H ₂ O]	0.5 mL	0.5 mL

F. Cálculos.

La lectura directa obtenida del colorímetro se expresa en microgramos de p-nitrofenol por mL de muestra.

La diferencia entre los resultados de determinaciones efectuadas en duplicado simultáneamente o inmediatamente una después de la otra, (por el mismo analista, con la misma muestra y en iguales condiciones) ha de ser inferior a 2.0 microgramos de p-nitrofenol liberado por mL de leche.

3.15.1.6 Método de Sanders y Sager modificado.

(Método Cuantitativo), AOAC (24), (27), (28), (29).

Aplicable a: Leche pasteurizada extragrasa, entera, semidesnatada, descremada fluidas o en polvo, mantequilla.

A. Cristalería:

- Embudo
- Fracos volumétricos 100.0 mL, 500.0 mL, 1000.0 mL
- Beakers 100.0 mL, 50.00 mL
- Ampolla de separación
- Agitadores de vidrio.
- Celdas de cuarzo.

B. Equipo:

- pHmetro
- Balanza analítica.
- Espectrofotómetro que permita la lectura a una longitud de onda de 610 nm.
- Termómetros

C. Materiales

- Baño de agua con termostato a 37°C.
- Papel filtro, Whatman 42 o similar.
- Cocina eléctrica
- Papel aluminio.
- Frasco lavador

-Goteros.

-Parafilm.

D. Reactivos:

1. Solución Tampón de borato y de hidróxido de bario: pH 10.6 ± 0.1 a 20°C .

Disolver 25.0 g de hidróxido de bario ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) en agua y diluir hasta 500.0 mL.

Disolver 11.0 g de ácido bórico (H_3BO_3) en agua y diluir hasta 500.0 mL.

Calentar las dos soluciones a una temperatura de 50°C y mezclar. Agitar y enfriar la mezcla a temperatura ambiente.

Ajustar el pH a 10.6 ± 0.1 , con la solución de hidróxido de bario y filtrar.

Conservar la solución en recipiente bien cerrado. Antes de su uso, diluir la solución tampón con la misma cantidad de agua.

2. Solución Tampón para el desarrollo del color.

Disolver 6.0 g de metaborato de sodio (NaBO_2) ó (12.6 g de $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 20.0 g de cloruro de sodio (NaCl) en agua y diluir hasta 1000.0 mL.

3. Solución Sustrato tamponado.

Disolver 0.5 g de fenilfosfato disódico ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 4.5 mL de solución tampón desarrollador del color. Añadir dos gotas de solución reactivo de Gibbs y dejar reposar durante 30 minutos. Extraer el color formado con 2.5 mL de alcohol butílico. Si fuese necesario, repetir la extracción del color. Luego de separar, descartar el alcohol butílico. Esta

solución puede conservarse algunos días en refrigeración. Desarrollar y extraer el color, una vez más, antes de emplear.

Pipetear 1.0 mL de esta solución en un matraz aforado de 100.0 mL y añadir la Solución Tampón de borato y de hidróxido de bario hasta aforar. Preparar el sustrato tamponado inmediatamente antes de su uso.

4. Solución Precipitante.

Disolver 3.0 g de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 0.6 g de sulfato de cobre II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua y llevar a 100.0 mL.

5. Solución Reactivo de Gibbs.

Disolver 0.040 g de dibromo-2,6 quinona-1,4 imida ($\text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 \cdot \text{NCl}$) en 10.0 mL de etanol de 96%. Conservar la solución en frasco ámbar en refrigeración. Desechar el reactivo cuando cambie de color.

6. Tampón de dilución de la coloración.

Diluir 10.0 mL de solución tampón para el desarrollo del color con agua y completar hasta 100.0 mL.

7. Solución de sulfato de cobre.

Disolver 0.05 g de sulfato de cobre II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua y llevar a 100.0 mL.

8. Solución Madre de fenol.

Disolver 0.200 ± 0.001 g de fenol puro en agua y llevar a 100.0 mL en matraz aforado. Esta solución puede conservarse durante algunos meses en refrigeración. Diluir 10.0 mL de esta solución hasta 100.0 mL con agua. Esta

solución presenta una concentración de 200.0 µg de fenol por mL y puede utilizarse para preparar soluciones más diluidas.

9. Agua destilada.

10. Alcohol *n*-butílico.

E. Procedimiento:

- Precauciones a tomar.

1. Evitar la exposición directa a la luz del sol.
2. Limpiar perfectamente todo el material de vidrio, tapones y, material de trasvase. Se recomienda enjuagarlos y hervirlos con agua o tratarlos por vapor.

Evitar el empleo de material plástico (tapones que pudieran contener fenol).
3. Evitar cuidadosamente todo indicio de saliva, puesto que ésta contiene fosfatasa.

- Preparación de la muestra.

Según el tipo de muestra se deben preparar de la siguiente manera:

1. Leche en polvo: Disolver 10.0 g de la muestra, pesados con precisión de 0.1 g en 90.0 mL de agua. La temperatura de disolución del polvo no debe exceder los 35 °C. Introducir 1.0 mL de leche reconstituida dentro de cada tubo de ensayo
2. Mantequilla: Pesar 1.0 g de muestra (por duplicado) sobre un pedazo de papel kraft. Introducir la muestra dentro del tubo de ensayo.
3. Leche fluida: Colocar 1.0 mL de la leche fluida dentro del tubo de ensayo.

4. Queso: Pesar 1.0 g de muestra (por duplicado) sobre un pedazo de papel kraft. Introducir la muestra dentro del tubo de ensayo.

- Determinación:

1. Cubrir el tubo que servirá como control de cada tipo de muestra con papel aluminio para un calentamiento uniforme (85°- 90°C). Calentar el tubo en un baño de agua a ebullición por dos minutos. Enfriar en agua fría a temperatura ambiente. Desde este punto tratar el tubo muestra y el control de manera igual.
2. Añadir 10.0 mL de la solución sustrato tamponado. Mezclar y colocar los tubos en baño de agua a 37°- 38°C. Incubar ahí por una hora. Agitando el contenido de vez en cuando.
3. Introducir los dos tubos con la muestra en el baño de agua hirviendo y calentar a 85°- 90°C durante dos minutos, y enfriar con agua a temperatura ambiente.
4. Añadir 1.0 mL de la solución precipitante, mezclar. EL pH de la mezcla debe ser de 9.0 - 9.1.
5. Filtrar con papel filtro seco Whatman N° 42 y embudo de 5 cm.; recoger 5.0 mL de filtrado en tubos graduados a 5.0 mL y 10.0 mL. Descartar los primeros filtrados hasta obtener un líquido nítido.
6. Agregar a cada tubo 5.0 mL de solución tampón desarrollador de color y 0.1 mL de solución reactivo de Gibbs. Mezclar. Dejar que se desarrolle el color a

temperatura ambiente y proteger de la luz solar, durante 30 minutos. El pH de la mezcla ha de ser 9.3 - 9.4.

7. Leer la intensidad del color azul midiendo en el espectrofotómetro la absorbancia de la muestra por referencia a la prueba en blanco a 610 nm y a los estándares preparados. (Ver Anexo N ° 10)

Cuadro N° 8: Adición de Reactivos en el Método de Sanders y Sager.

Reactivo	Tubo Muestra	Tubo Control Negativo
Sustrato Tamponado	10.0 mL	10.0 mL
Muestra	1.0 mL	1.0 mL (Llevar a ebullición)
Solución Precipitante	1.0 mL	1.0 mL
Tampón desarrollador de color	5.0 mL	5.0 mL
Reactivo Gibbs	0.1 mL	0.1 mL

- Preparación de la curva patrón.

1. Preparación de Soluciones patrón para estándares: Pipetear en cuatro frascos volumétricos de 100.0 mL. 1.0, 3.0, 5.0 y 10.0 mL de la solución madre 200.0 µg/ mL (Ver pág. 114). Adicionar agua destilada y agitar y aforar. Estas soluciones contienen respectivamente: 2.0, 6.0, 10.0, 20.0 µg de fenol por mL. (Soluciones patrón)
2. Pipetear 1.0 mL de cada solución patrón en tubos de ensayo para obtener una serie de muestras conteniendo 0.0, 2.0, 6.0, 10.0, 20.0 µg de fenol, como

se indica en el cuadro N° 9. El blanco se obtiene pipeteando 1.0 mL de agua destilada.

3. Pipetear sucesivamente en cada tubo de ensayo 1.0 mL de la solución de sulfato de cobre, y 5.0 mL de la solución tampón coloreada, 3.0 mL de agua y 0.1 mL de solución reactivo de Gibbs. Mezclar.
4. Dejar reposar los tubos de ensayo a temperatura ambiente y protegidos de la luz solar directa durante 30 minutos.
5. Medir la absorbancia del contenido de cada uno de los tubos por referencia al valor cero, a 610 nm.
6. Establecer la curva patrón tomando nota de los valores de absorbancia en función de las cantidades de fenol en microgramos.

Cuadro N° 9: Preparación de Estándares de fenol para Curva patrón del método de Sanders y Sager.

Reactivo	Estándar 0 µg de fenol/mL	Estándar 2 µg de fenol/mL	Estándar 6 µg de fenol/mL	Estándar 10 µg de fenol/mL	Estándar 20 µg de fenol/mL
Solución Patrón respectiva (2,6,10, 20 µg de fenol/ mL)	-----	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Agua	4.0 mL	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL
Sustrato tampón	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Sulfato de Cobre	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Reactivo de Gibbs	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL

F. Cálculos.

Para calcular la actividad de la fosfatasa expresada en microgramos de fenol por mL o de muestra, empleando la formula siguiente:

$$\text{Actividad de la fosfatasa} = 2.4 \times P$$

Donde:

(P): Es la cifra convertida en microgramos de fenol obtenida con referencia a la curva patrón.

2.4: Es factor de multiplicación.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente una después de la otra, por el mismo analista y sobre la misma muestra, y en las mismas condiciones, no debe exceder de 2.0 µg de fenol por mL de muestra.

3.15.1.7 Prueba con 4-aminoantipirina para determinar Fosfatasa alcalina.

(Método Cuantitativo). ⁽⁵⁵⁾

Aplicable a: Leche fluida, mantequilla, leche en polvo y crema.

A. Cristalería:

- Tubos de ensayo.
- Probetas morh graduada de 1.0 mL, 5.0 mL.
- Agitadores.
- Micropipeta con capacidad para 50.0 μ L.

B. Equipo:

- Espectrofotómetro
- Termómetro

C. Materiales:

- Agitador de Vórtice.
- Baño de agua con termostato.
- Gradilla para tubos de ensayo.

D. Preparación de la muestra:

- Leche en polvo: reconstituir aproximadamente 1.0 g en 10.0 mL de agua.
(Mantener la temperatura por debajo de 35 °C).
- Leche fluida: tal cual.
- Manteca: pesar aproximadamente 1.0 g de muestra, extraerla por debajo de la superficie con una espátula o cuchillo limpio.
- Crema de leche: tal cual.

Si las muestras quedaran turbias, filtrar por papel filtro. La centrifugación no da buenos resultados.

E. Reactivos:

-Solución sustrato de Fenilfosfato disódico (0.0014 M), en buffer de pH 10 conteniendo una solución de Aminometilpropanol (3 M) y solución 4-aminoantipirina (0.029 M). Conservar en refrigeradora no más de 5 meses.

-Reactivo de color: Ferrocianuro de potasio (0.01 M). Estable durante 5 meses a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

-Estándar: Solución de fenol (2.0 µg/mL)

Pesar 0.002 g de fenol, disolver con agua libre de CO₂ y llevar al aforo en un frasco volumétrico de 1L.

F. Procedimiento:

Preincubar 0.5 mL de solución de sustrato unos 4 minutos a 37°C.

Agregar luego, 50.0 µL de muestra, mezclar de ser posible en vortex e incubar exactamente 10 min exactos (El tiempo y la temperatura de reacción son críticos. Un minuto o 1 °C en exceso o defecto pueden producir un error de ±10 %). Realizar paralelamente el estándar y un blanco de reactivos. Agregar 2.5 mL de reactivo de color y retirar los tubos del baño. Mezclar inmediatamente de ser posible en vortex.

Medir la Absorbancia a (520 nm), dentro de los 30 min. Ajustar el cero del espectrofotómetro con agua destilada. (Ver Anexo N °11)

Cuadro N° 10: Adición de Reactivos en el Método de
4-aminoantipirina para Fosfatasa alcalina.

Reactivo	Tubo blanco	Tubo estándar	Tubo muestra
Sustrato (mL)	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Muestra (µL)	-----	-----	50.0 µL
Estándar de Fenol (µL)	-----	50.0 µL	-----
Agua destilada (µL)	50.0 µL	-----	-----
Reactivo de color (mL)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL

3.15.1.8 Método Fluorimétrico para Fosfatasa alcalina.

(Método Cuantitativo), ⁽⁵¹⁾

Aplicable a: Leche y bebidas en base a leche.

El método fluorimétrico para la determinación de actividad de fosfatasa alcalina en leche entera pasteurizada, leche semidescremada, leche descremada y leches saborizadas. El método es aplicable a leche de vaca, oveja, cabra y a bebidas en base a leche.

Cuando se usa el sustrato, la medición fluorimétrica de la actividad de la fosfatasa alcalina, se realiza a 38°C, durante un periodo de 3 min. Esto incluye preincubación de sustrato y muestra, seguido de múltiples lecturas cinéticas de la tasa de reacción. Este está disponible como un sistema de ensayo Fluorophos[®] (kit) de Advanced Instruments Inc.

Este Sistema de ensayo contiene los reactivos necesarios para realizar las pruebas, los reactivos y los instrumentos necesarios para el Sistema Fluorophos[®].

A. Cristalería:

- Celdas: De vidrio no fluorescente de 12 mm de diámetro y 75 mm de largo.
- Dispensador de volumen fijo: Capaz de suministrar 2.0 mL.
- Pipeta de desplazamiento positivo o desplazamiento de aire, de 0.075 mL de capacidad.
- Pipeta 2.0 mL de capacidad.
- Frascos volumétricos de 100.0 mL de capacidad.

B. Equipo:

-Filtro Fluorimétrico: Con porta celda termostáticamente controlado, capaz de operar a $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y ópticas en ángulo recto, permitiendo un estímulo a una longitud de onda de 440 nm y emisión entre 520 nm y 560 nm (por ejemplo, instrumento Fluorophos[®]). Las mediciones debieran ser optimizadas de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

C. Materiales:

-Cubo incubador: Capaz de mantener una temperatura de $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, apropiado para sostener las celdas.

-Mezclador de vórtice (vortex).

-Baño de agua, capaz de mantener una temperatura de $63^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

-Parafilm u otra película adecuada de grado laboratorio.

D. Reactivos.

-Sustrato Fluorophos[®]: Este es un sustrato aromático de ester monofosfórico, no fluorescente, 2'-[2 benzotiazolil]-6'-fosfato hidroxibenzotiazol (Fluorophos[®]). Este está disponible en frascos que contienen 144.0 mg de sustrato Fluorophos[®] en polvo.

-Solución sustrato tampón, solución tampón de dietanolamina (DEA): En frasco de 240.0 mL con una concentración de 204.0 mol/L y un pH 10.0.

La solución sustrato tampón permanece estable durante dos años si se le almacena en frasco cerrado, entre los 2°C y 8°C .

-Sustrato de trabajo: Consiste en la mezcla del contenido del frasco de solución sustrato tamponado al contenido del frasco de sustrato Fluorophos[®] previamente llevadas a la temperatura ambiente. Mezclar bien por inversión, durante 3 minutos, empleando un frasco de vidrio ámbar para proteger la solución de la luz.

Dejar que la solución formada permanezca a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos antes de usar.

Utilizar el ensayo análogo digital: A/D (ver pág.125) para probar la idoneidad del sustrato de trabajo listo para usar.

El sustrato de trabajo permanece estable durante 60 días cuando se protege de la luz y se almacena entre 2°C y 8°C; o durante 8 horas cuando se almacena a 38°C. No usar el sustrato de trabajo si se obtiene una lectura de 1200.

El volumen obtenido de sustrato de trabajo (240.0 mL) es suficiente para aproximadamente, 115 ensayos.

- Soluciones de trabajo calibradoras, Fluoroyellow[®] [2'-(2-benzotiazolil)-6'-hidroxibenzotiazol] en tampón DEA: Estas cuatro soluciones contiene una concentración diferente de Fluoroyellow[®], y permanecen estables durante 18 meses cuando se almacenan entre 2°C y 8°C.

Solución calibradora A: Contiene 0.0 µmol/L de Fluoroyellow[®]

Solución calibradora B: Contiene 0.01724 µmol/L de Fluoroyellow[®].

Solución calibradora C: Contiene 0.03448 µmol/L de Fluoroyellow[®].

Solución de control diaria de instrumento: Contiene 0.03448 $\mu\text{mol/L}$ de Fluoroyellow[®].

E. Preparaciones.

Leche libre de fosfatasa alcalina.

Preparar leche libre de fosfatasa, colocando cuidadosamente la porción de leche dentro de un tubo de ensayo o contenedor adecuado, asegurándose que la leche no toque el borde o los costados del contenedor.

Colocar el tubo con la porción de leche en baño de agua a 95 °C. Precalear la porción de leche a 95 °C antes de iniciar el periodo de calentamiento de 5 minutos a esa temperatura. Controlar la temperatura utilizando un termómetro o un sensor de sonda colocado en el centro del tubo o del contenedor. Cuando la porción de leche alcance los 95 °C, inmediatamente iniciar el periodo de calentamiento de 5 min. Luego del periodo de calentamiento, enfriar rápidamente el conjunto.

Ensayar la porción de leche así tratada para asegurarse que su actividad fosfatasa alcalina es menor que 10.0 mU/L.

Preparación de la muestra de ensayo.

Mezclar cuidadosamente todas las muestras de ensayo antes de analizar.

Generalmente no es necesario precalentar las muestras de ensayo.

Muestras de ensayo pasteurizadas.

Usar muestras de ensayo pasteurizadas.

Diluciones de las muestras libres de Fosfatasa alcalina.

Preparar diluciones de las leches utilizando leche libre de fosfatasa alcalina, con el propósito de llevar sus niveles de fosfatasa alcalina dentro de los rangos analíticos del ensayo (< 2000 mU/L). Mezclar bien las soluciones diluidas.

F. Procedimiento.**Verificación de funcionamiento de los instrumentos.**

Es importante verificar el funcionamiento de los instrumentos para derivar, pérdidas de luz y estabilidad, antes de analizar muestras de ensayo. Al operar el filtro Fluorimétrico seguir los siguientes controles:

-Ensayo diario A/D (análogo-digital): utilizado para verificar el funcionamiento apropiado del equipo, mediante medición de la exactitud del canal de conversión A/D y monitoreado del canal A/D para deriva, sobre exposición o temperatura.

-Ensayo diario de control de instrumento, utilizando la solución de control diario del instrumento para monitorear cualquier deriva electrónica u óptica en el fluorímetro.

Para el monitoreo diario de los parámetros del instrumento de precisión se recomienda el uso de los controles externos positivos, negativos y normales.

G. Calibración.

Las curvas de calibración son generalmente estables. Sin embargo, se debe recalibrar el instrumento que ha sido ya calibrado, cuando se instale inicialmente el fluorímetro, cada vez que se realicen servicios de mantenimiento

que puedan afectar la calibración graduada, cuando los valores de ensayos de control muestren resultados inaceptables o cada tres meses.

Si hay cambios en la curva de calibración, recalibrar el instrumento utilizando un nuevo conjunto de soluciones calibradoras A, B y C. Establecer una curva de calibración por cada tipo de producto a ser ensayado.

Mezcle las soluciones calibradas, A, B y C, mediante inversión cuidadosa antes de usar. Transferir a seis celdas; previamente rotuladas utilizando la pipeta, 2.0 mL de solución calibradora A, solución calibradora B y solución calibradora C, respectivamente, cada una en duplicado (6 celdas en total). Colocar las celdas en el cubo incubador. Completar la calibración dentro de los 10 minutos siguientes a la adición de la muestra de ensayo al calibrador.

Empezando con la solución calibradora A, realizar la siguiente rutina de calibración: Limpiar la parte externa de cada celda con papel suave antes de colocarla en el filtro fluorímetro. Cuando se use el instrumento Fluorophos[®], oprimir CALIB y seleccionar el menú ALP Dairy. Entrar en Menú y oprimir ENTER cuando el producto a ser calibrado se muestre. Empezando con la solución calibradora A, insertar esa solución en el fluorímetro y presionar START. Cuando la medición esté terminada, medir la segunda solución calibradora A, para establecer la relación de calibración en el instrumento.

Una vez que la calibración se complete, proceder a analizar las muestras de ensayo.

H. Determinación.

Utilizando el dispensador fijo de volumen colocar 2.0 mL de sustrato de trabajo dentro de una celda previamente rotulada. Colocar la celda en el cubo incubador, regular a 38°C y calentar durante 15 minutos.

Utilizando la pipeta agregar al sustrato 0.075 mL de la porción de ensayo bien mezclada. Cubrir la celda con parafilm. Inmediatamente, mezclar durante 5 segundos los contenidos, utilizando el mezclador de vórtice, o por inversión cuidadosa de la celda. Limpiar la parte exterior de la celda con papel suave y colocarla en el filtro fluorimétrico.

Oprimir el comando TEST, aparece ALP Dairy, luego oprimir ENTER. Buscar en el menú y oprimir ENTER cuando se muestra el producto a ser analizado. Luego oprimir el comando START para iniciar en el modo descendente, mientras el sustrato y la muestra están siendo calentadas a 38°C. Después de los 60 segundos, el fluorímetro inicia la medición, mostrando la fluorescencia de la muestra en unidades de fluorescencia (FLU). El conteo se inicia alrededor de 200 FLU y lentamente se incrementa por 2 minutos siguientes. Al final del periodo de 3 minutos, el instrumento Fluorophos[®] realiza otra determinación. Generalmente se obtiene entonces un resultado valido. Si aún así se obtiene nuevamente una lectura inestable de error, se debe repetir la determinación completa con una nueva muestra de ensayo.

I. Ensayos de Control.

Controles del sistema y del reactivo.

Ensayo de A/D.

Cuando se utilice el instrumento Fluorophos[®] realizar diariamente el ensayo A/D, antes de iniciar los ensayos.

Colocar 2.0 mL de la solución de control diario del instrumento en una celda rotulada. Colocar la celda en el cubo incubador a 38°C, durante 10 minutos.

Acceder al ensayo A/D a través del menú SETUP. Oprimir el comando SETUP, seleccionar el ítem ensayo A/D en el menú, oprimiendo < o >. Con el porta celdas vacío, oprimir START. Permitir que la configuración aparezca en la pantalla para estabilizar.

En la pantalla se debería leer 302 ± 4 . Si la lectura está fuera de ese rango, limpiar los filtros de estímulo y de emisión y repetir el ensayo de A/D.

Insertar una celda precalentada con la solución control en el porta celda. Cerrar la tapa. Cuando la pantalla esté estable, registrar el valor mostrado, el que debería ser 602 ± 12 . Si está fuera de este rango, usar el destornillador pequeño suministrado, para girar lentamente el tornillo del potenciómetro, en el costado izquierdo del instrumento en sentido de las agujas del reloj o en sentido inverso a las agujas del reloj, cuando sea necesario hasta leer 602 en la pantalla.

El ensayo A/D se puede utilizar también para probar la condición de listo para usar, del sustrato de trabajo. Un sustrato, recién hecho, sólo en la modalidad

A/D, generalmente da una lectura en pantalla de aproximadamente 650 FLU, la cual se incrementa en el tiempo.

No utilizar el sustrato de trabajo cuando se obtenga una lectura en la pantalla de mas de 1200 FLU.

Controles Positivo, Negativo y de PhosphaCheck-N™.

Después de la calibración del canal usado para leche de vaca, analizar las tres soluciones control (es decir, positivo, negativo y PhosphaCheck-N™), agregando 75.0 µL de cada solución de control a 2.0 mL de sustrato precalentado. Realizar el ensayo ALP.

La lectura para el control negativo debe ser < 10 y para el control de PhosphaCheck-N™ debe ser < 40.

Muestra de ensayo y controles instrumentales relacionados.

Ensayos de control negativo.

Incluir un ensayo de control negativo para cada grupo de muestras a analizar. Calentar una muestra de ensayo para dejarla libre de fosfatasa alcalina. La lectura del instrumento debe ser menor que 10.0 mU/L, indicando que no se ha detectado actividad de fluorescencia. Si el valor excede de 10.0 mU/L repetir los Controles Positivo, Negativo y de PhosphaCheck-N™ anteriormente presentados.

Ensayo de control positivo.

Incluir uno o más ensayos de control positivo para cada grupo de muestras a analizar. Preparar muestras en o cerca de los niveles de decisión utilizando muestras de leche cruda diluida con leche libre de fosfatasa alcalina.

Ensayo de sustancias que interfieren.

Cuando se obtienen valores de ALP superiores a los esperados, agregar con una pipeta, 0.075 mL de la porción de ensayo, a una celda con 2.0 mL de solución calibradora A, La cual ha sido previamente calentada durante 10 minutos en el cubo incubador, regulado a 38°C, y mezclar.

Colocar la celda conteniendo esta mezcla en el Instrumento Fluorophos[®] y ensayar como en la Calibración. Si el valor obtenido excede 20.0 mU/L, se está mostrando la presencia de una sustancia que interfiere. En este caso, repetir el ensayo utilizando una muestra fresca.

Ensayo de control de fosfatasa alcalina microbiana estable al calor.

Agregar otra porción de ensayo a un tubo (2.0 mL). Colocar un termómetro o una sonda termo sensora dentro del tubo y colocar el conjunto en el baño de agua regulado a 63 °C. Cuando la porción de ensayo alcance los 63°C, mantener a esa temperatura durante 30 minutos, luego enfriar rápidamente. Determinar la actividad fosfatásica residual de acuerdo al método de determinación mencionado. Cualquier actividad residual es debida a la presencia de fosfatasa alcalina microbiana estable al calor.

J. Cálculos y expresión de resultados.

Relación de calibración.

Los resultados son calculados automáticamente por el Instrumento Fluorophos[®], mediante la construcción de algoritmo al interior del filtro fluorímetro. Si los resultados se deben calcular manualmente proceder como sigue:

Leer los valores de fluorescencia de la solución calibradora B y solución calibradora C, leídas contra la solución calibradora A regulada a cero Fluorescencia en el filtro fluorímetro.

Calcular la relación de calibración, K, utilizando la ecuación (1):

$$K = \frac{F_C + 2F_B}{4}$$

En que:

- K = valor numérico de la relación de calibración de la curva de calibración establecida;
- F_C = valor numérico de la fluorescencia obtenida por la medición de la solución calibradora C, contrastada con la solución calibradora A, regulada a cero fluorescencia;
- F_B = valor numérico de la fluorescencia obtenida por la medición de la solución calibradora B, contrastada con la solución calibradora A, regulada a cero fluorescencia.

Cálculo.

Calcular la actividad de la fosfatasa alcalina, A_p , utilizando la ecuación (2):

$$A_p = \frac{F_{av} \times C_B}{K \times V} \times f$$

En que:

A_p = valor numérico de la actividad de la fosfatasa alcalina de la muestra de ensayo en miliunidades de actividad de enzima por litro;

F_{av} = valor numérico de la cantidad promedio de fluorescencia producida por minuto, por la porción de ensayo, medida en contraste con la solución calibradora A, ocurrida desde el inicio del segundo minuto hasta el final del tercer minuto;

C_B = concentración de Fluoroyellow[®] en la solución calibradora B, en micromoles por 2.0 mL de calibrador;

f = factor de dilución (1×10^6) en el caso de muestras pasteurizadas; en el caso de muestras de ensayo de leche cruda f es igual a 1×10^6 por el factor de dilución f_i de la muestra de ensayo ($f = f_i \times 10^6$);

V = valor numérico del volumen de muestra en mililitros.

Expresión de los resultados del ensayo.

Expresar los resultados del ensayo en la unidad entera más cercana de una miliunidad.

Actividad de la fosfatasa alcalina, ALP: actividad de la fosfatasa alcalina presente en el producto, determinado por el procedimiento.

La actividad de la fosfatasa alcalina se expresa como milésimos de unidad de actividad de enzima por Litro (mU/L).

Esta unidad de actividad fosfatasa alcalina, es la cantidad de enzima fosfatasa alcalina que cataliza la transformación de 1.0 μmol de sustrato, por minuto.

3.15.1.9 METODO PARA DETERMINAR REACTIVACION DE FOSFATASA ALCALINA DEBIDO A TRATAMIENTOS (HTST) Y (UHT).

Método diferenciador para determinar fosfatasa alcalina reactivada en lácteos tratados térmicamente con los métodos alta temperatura corto tiempo (HTST), ultra pasteurización (UP) y temperatura ultra alta. Diferenciación entre fosfatasa reactivada y fosfatasa residual.

(Método Cualitativo), AOAC, (12), (28), (29).

Aplicable a: Leche fluida y a queso.

A. Cristalería:

- Tubos de ensayo.
- Pipeta volumétrica de 1.0 mL y 5.0 mL.
- Agitadores de vidrio.

B. Equipo:

- Termómetro.

C. Materiales:

- Cocina eléctrica.
- Baño de agua con termostato.
- Baño de hielo.

D. Reactivos

1. Solución de Acetato de Magnesio: disolver 35.4 g de $Mg (C_2H_3O_2)_2 \cdot 4 H_2O$ en 25.0 mL de agua. Calentar ligeramente para facilitar la disolución. Transferir la solución a un frasco volumétrico de 100.0 mL, enjuagar varias veces al

recipiente desde donde se transfiere la solución con porciones de 5.0 mL de agua y agregar los enjuagues al frasco volumétrico. Dejar enfriar la solución y luego llevar a 100.0 mL. Esta solución contiene 40.1 mg de magnesio por mililitro.

2. Control y diluyente: Colocar 10.0 mL de cada muestra a ensayar en baño de agua a ebullición por un minuto después que la muestra alcance 95°C. Enfriar la muestra y usar una porción para las diluciones como se requiera, para el control llevado a ebullición.

E. Procedimiento:

1. Colocar una alícuota de 5.0 mL de la muestra a analizar en un tubo de ensayo con tapón de rosca (libre de fenol) y adicionar 0.1 mL de agua. A un segundo tubo idéntico adicionar una alícuota de 5 ml de la misma muestra, y agregar 0.1 mL de solución de acetato de magnesio con ayuda de una pipeta Mohr 0.1 mL, y agitar bien.
2. Incubar ambas alícuotas por 1 hora en baño de agua a 34 °C, agitar las muestras ocasionalmente mientras estén en el baño de agua.
3. Remover las muestras del baño de agua y enfriar en agua con hielo. Diluir 1.0 mL de la muestra conteniendo magnesio con 5.0 mL de la correspondiente leche llevada a ebullición o el producto lácteo control (dilución 1+5). (Ver Anexo N° 12)
4. Usando el procedimiento para determinar Fosfatasa alcalina residual, seguir cualquiera de los métodos anteriores desde su inicio (ya sea el método

espectrofotométrico modificado, el método de Cornell o el método de Rutgers, método fluorométrico), ensayar la actividad fosfatasa en la muestra no diluida y sin magnesio y también la muestra diluida 1+5 adicionada con magnesio.

Cuadro N° 11: Adición de Reactivos en el tratamiento para determinar fosfatasa reactivada.

Reactivo	Tubo Negativo	Tubo Positivo
Muestra	5.0 mL	5.0 mL
Agua	0.1 mL	-----
Solución Acetato de Mg	-----	0.1 mL
Leche hervida	-----	5.0 mL

F. Interpretación: Si la dilución de la muestra conteniendo magnesio tiene una igual o mayor actividad que la de la muestra sin diluir y sin magnesio, la muestra se considerara que es negativa para fosfatasa residual e indicará que hay reactivación de la enzima. Si la muestra diluida presenta menos actividad que la muestra diluida, y si los resultados de la prueba para fosfatasa convencional son positivos, la muestra es positiva para fosfatasa residual.

G. Precauciones:

Mantener los tubos con la muestra fríos hasta realizar el análisis de fosfatasa alcalina residual posterior a este tratamiento.

Un resultado falso-positivo en la prueba de fosfatasa puede obtenerse cuando la muestra contiene fosfatasa reactivada y se ha mantenido por periodos mayores a 4 horas aproximadamente a 16 °C o 2 horas a aproximadamente a

20 °C. La reactivación de la fosfatasa en un producto sin refrigerar será ensayada como fosfatasa residual.

Un resultado positivo puede ser obtenido con productos lácteos esterilizados debido a la fosfatasa reactivada. Sin embargo, si el producto esterilizado se mantiene a temperatura ambiente por periodos prolongados (2 horas a 20°C) el ensayo diferencial podría no ser aplicable. Para confirmar la presencia o ausencia de fosfatasa alcalina, seguir el procedimiento para fosfatasa microbiana (ver anexo N° 4) y emplear controles apropiados. Si la prueba de fosfatasa resulta positiva, esto podría indicar presencia de fosfatasa microbiana. Entonces podría ser necesaria como último recurso una prueba microbiológica para evaluar la calidad del producto.

H. Interpretación:

Si la muestra que fue diluida y adicionada con magnesio presenta una actividad igual o mayor que la muestra no diluida y sin magnesio, la muestra se debe considerar negativa para Fosfatasa alcalina residual e indica que la Fosfatasa detectada originalmente es de origen reactivado.

Si la muestra diluida presenta menor actividad que la muestra sin diluir, se debe considerar positiva para Fosfatasa alcalina residual siempre que en la prueba original hubiese sido positiva.

Resultados falso positivos podrían obtenerse para fosfatasa alcalina residual si las muestras reactivables se encontrasen a temperaturas mayores (-4°C a -6°C; 21°C a 24°C) por tiempo \geq a 2 horas.

3.15.2 MÉTODOS PARA DETERMINAR LACTOPEROXIDASA EN LACTEOS.

3.15.2.1 Reacción de Dupoy. (Método Cualitativo).

Aplicable a: Leches Ultra pasteurizadas.

A. Cristalería:

- Tubos de ensayo
- Pipeta morh de 5.0 mL.
- Beaker 250.0 mL
- Agitadores de vidrio

B. Materiales:

- Gradilla de tubos de ensayo
- Goteros

C. Reactivos

- Tampón fosfato 0.05 M pH=7
- H₂O₂ 0.04 M preparada recientemente.
- Guayacol 0.04 M
- Leche fresca (cruda) conteniendo lactoperoxidasa.

D. Procedimiento.

1. Adicionar 2.0 mL de leche en un tubo de ensayo y llevar a 100 °C en baño de agua durante al menos 10 min. Este servirá para control negativo.
2. Enumerar 3 tubos de ensayo y adicionar los reactivos en el orden y cantidad (expresada en mL) indicada en el Cuadro N° 12 (ya que el H₂O₂ y el

Guayacol deben ser mezclados en tampón fosfato 0.05 M, pH 7 previamente a la adición de la muestra). Agitar todos los tubos antes y después de poner la leche y observar el color desarrollado en cada tubo durante 10 minutos. (Ver Anexo N° 13)

Cuadro N° 12: Adición de Reactivos en la Prueba de Dupoy.

N° Tubo	1 Blanco	2 Muestra	3 Control negativo
Tampón Fosfato	3.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
H ₂ O ₂ 0.04 M	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Guayacol 0.04 M	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Leche fresca	---	1.0 mL	---
Leche hervida	---	----	1.0 mL

3.15.2.2 Método de Storch. (Método Cualitativo).

Aplicable a: Leches Ultra pasteurizadas.

A. Cristalería:

- Pipeta de morh 10.0 mL
- Tubos de ensayo
- Agitadores de vidrio
- Frascos volumétricos 100.0 mL
- Beaker 50.0 mL, 100.0 mL, 250.0 mL

B. Materiales:

- Goteros
- Cocina eléctrica

C. Reactivos:

- Solución ácida de peróxido de hidrógeno al 2% (diluida con agua destilada) y agregar 0.1% de ácido sulfúrico concentrado.
- Solución de p-fenilendiamina al 2%: Pesar 2.0 g de p-fenilendiamina y preparar la solución con 100.0 mL de agua destilada.

Muestra y Controles:

- Leche cruda: como control positivo de la prueba y rotular como: (Lc).
- Leche muestra a analizar: ultra pasteurizada o pasteurizada comercial y rotular como: (Pr).
- Leche sobrecalentada: preparar en el laboratorio sobrecalentando la leche arriba de los 77.8 °C y rotular como:(Sc).

D. Determinación:

1. Colocar 10.0 mL de cada una de las muestras preparadas (homogénea) con una pipeta en los respectivos tubos de ensayo rotulados Lc, Pr y Sc.
2. Adicionar a cada tubo, 2 gotas de la solución acida de peroxido de hidrógeno al 0.2 % y mezclar.
3. Adicionar a cada tubo, 2 gotas de la solución de p-fenilendiamina al 2 % y mezclar.
4. La formación de un intenso color azul es indicativo de que la muestra contiene lactoperoxidasa y por ende no ha sido calentada por encima de los 77.8°C, mientras que si la muestra permanece blanca, ha sido sobrecalentada. La validez de los resultados en los controles debe estar acompañada por la coloración azul (positiva) en la leche cruda (Lc) y por la ausencia de la coloración en la leche sobre calentada (Sc) preparada en el laboratorio. (Ver Anexo N° 14)

Cuadro N° 13: Adición de Reactivos en la Prueba de Storch.

Reactivo	Tubo Control Positivo Lc	Tubo Muestra Pr	Tubo Control Negativo Sc
Muestra	10.0 mL	10.0 mL	10.0 mL
H ₂ O ₂ 0.2%	2 gotas (0.1 mL)	2 gotas (0.1 mL)	2 gotas (0.1 mL)
P-fenilendiamina	2 gotas (0.1 mL)	2 gotas (0.1 mL)	2 gotas (0.1 mL)

3.15.2.3 Método de Rothenfusser. (Método Cuantitativo) (48).

Aplicable a: Suero de leche ultra pasteurizada o pasteurizada.

A. Cristalería:

-Celdas de cuarzo.

-Micropipetas con capacidad para 50.0 μL , 250.0 μL .

-Pipetas morh graduada 5.0 mL.

B. Equipo:

-Espectrofotómetro.

-Agitador o mezclador de vórtice.

C. Materiales:

-Parafilm.

D. Reactivos

-Tampón Fosfato pH: 6.8

Disolver 35.61 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y llevar con agua destilada en frasco volumétrico de 1000.0 mL. Rotular como solución (a). Pesar 27.60 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y llevar a un frasco volumétrico de 1000.0 mL con agua destilada. Rotular como solución (b). Tomar 49.0 mL de la solución (a) y llevar a un frasco volumétrico de 200 mL y adicionar 51 mL de la solución (b), luego aforar con agua destilada.

-Reactivo de Rothenfusser: Se prepara mezclando las soluciones de Parafenilendiamina y la solución de Guayacol, las cuales se preparan por individual de la siguiente forma.

-Solución de Parafenilendiamina: Pesar 19.0 g de clorhidrato de parafenilendiamina y disolver en 15.0 mL de agua destilada.

-Solución de Guayacol: Pesar 2.0 g de guayacol diluir en 135.0 mL de alcohol etílico al 96 %. Conservar en frasco bien cerrado.

Mezclar ambas soluciones y conservar en refrigeración y en frasco ámbar.

-Solución de H₂O₂ al 1 %.

En un frasco volumétrico de 100 mL colocar 3 mL de H₂O₂ al 35% y aforar con agua.

E. Procedimiento.

Colocar directamente en una celda adecuada 3.0 mL de tampón fosfato; 30.0 µL de suero; 250.0 µL de reactivo Rothenfusser y 50.0 µL de H₂O₂ al 1%. Agitar dejar reposar durante 2 min.

Leer en el espectrofotómetro en términos de absorbancia a 540 nm contra un blanco en el cual no se adiciona la muestra. (Ver Anexo N° 15)

Cuadro N° 14: Adición de Reactivos en el método de Rothenfusser.

Reactivo	Celda Muestra	Celda Blanco
Muestra suero	30.0 µL	-----
Tampón fosfato	3.0 mL	3.0 mL
Reactivo Rothenffuser	250.0 µL	250.0 µL
H ₂ O ₂ 1%	50.0 µL	50.0 µL

3.15.2.4 Método ABTS [Ácido 2,2- Azino-di (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)]. (Método Cuantitativo) ⁽⁴⁸⁾.

Aplicable a: Suero de leche pasteurizada o ultra pasteurizada.

A. Cristalería:

- Tubos de ensayo.
- Micro pipetas con capacidad para 25.0 μ L.
- Celdas de cuarzo.

B. Equipo:

- pHmetro.
- Agitador de vórtice.

C. Materiales:

- Papel parafilm.

D. Reactivos:

- Tampón acetato pH 4.4

Disolver 8.2 g de acetato de sodio en agua destilada, llevar a pH 4.4 con ácido acético al 10 % y aforar a 1000.0 mL en frasco volumétrico.

- Tampón fosfato pH 5.5

Disolver 13.61 g de KH_2PO_4 y llevar en frasco volumétrico a 1000.0 mL con agua destilada. Rotular como solución (a). Luego pesar 22.82 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y llevar en frasco volumétrico a 1000.0 mL con agua destilada. Rotular como solución (b). Mezclar a 50.0 mL de la solución (a) agregar la solución (b) hasta obtener pH 5.5.

-Soluciones ABTS 1M.

Disolver 55.0 mg de ABTS en tampón acetato pH 4.4 aforar a 100.0 mL disolver 55.0 mg de ABTS en tampón fosfato pH 5.5 y llevar a 100.0 mL.

-Solución H₂O₂ 0.005 M.

En un frasco volumétrico de 100.0 mL adicionar 45.0 µL de peroxido de hidrogeno al 35 % y aforar con agua destilada. La concentración de esta solución es controlada a 240 nm contra agua destilada. La absorbancia debe ser 0.22±0.01.

E. Procedimiento.

Colocar en un tubo de ensayo 5.0 mL de la solución sustrato de ABTS, agregar 25.0 µL de suero acido y agitar. Dividir en dos porciones de 2.5 mL cada una y colocarlas en dos celdas, una de ellas se constituirá en el blanco. En la otra adicionar 50.0 µL de H₂O₂ 0.005 M, se mezcla y se mide la absorbancia a 413 nm cada minuto durante 5 minutos. (Ver Anexo N° 16)

Cuadro N° 15: Preparación de Reactivo ABTS /Muestra en el método ABTS.

Reactivo ABTS +Suero muestra	
Sustrato ABTS	5.0 mL
Suero ácido	25.0 µL

Cuadro N° 16: Adición de Reactivos en el método ABTS

Reactivo	Celda Muestra	Celda Blanco
Suero +ABTS	2.5 mL	2.5 mL
H ₂ O ₂ 0.005 M	50.0 µL	-----

F. Cálculos e Interpretación.

La actividad de la enzima se calcula por la fórmula:

$$Unidades / mL = \frac{DA_{413} / \text{min} \times 5.0}{32.4 \times 0.025}$$

Donde:

DA_{413} : incremento de la absorbancia/ min.

5.0: volumen del sustrato (mL)

32.4: Coeficiente de extinción a las condiciones descritas

0.025: cantidad de muestra (mL)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de estudio

El tipo de estudio que se realizó es de carácter Bibliográfico, enfocado a la recopilación de Metodologías oficiales y no oficiales para la determinación de Fosfatasa alcalina residual y para determinar Fosfatasa alcalina reactivada, así como también para la determinación de Lactoperoxidasa en leches y quesos.

4.2. Investigación Bibliográfica.

Se visitaron diferentes bibliotecas educativas privadas y gubernamentales:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la facultad de Ingeniería de La Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la facultad de Agronomía de La Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de La Universidad de El Salvador.
- Centro de Documentación e Información en Salud de la OPS/OMS.
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. (USAM)
- Biblioteca de la Universidad Nueva San Salvador (UNSSA).
- Biblioteca de la Universidad Dr. José Matías Delgado.
- Biblioteca “B.P. Florentino Idoate. S. J.” de la Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas” (UCA).
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Escuela Nacional de Agricultura.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería.

-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

4.3. Investigación de Campo

Se entrevistaron a diferentes profesionales cuyo trabajo está enfocado al control de la calidad en productos alimenticios con el fin de conocer que metodologías para determinar Fosfatasa alcalina residual, reactivada y Lactoperoxidasa, se aplican en la actualidad en el país, en la verificación del tratamiento calorífico de las leches procesadas y quesos. Esto se realizó a través de una encuesta dirigida a los profesionales encargados de cada laboratorio, y posteriormente se investigaron en las diferentes fuentes bibliográficas los métodos que se pueden implementar. Así también se hizo una encuesta a diferentes industrias procesadoras de lácteos para conocer que análisis fisicoquímicos y microbiológicos se realizan a los productos que elaboran.

Se visitaron los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de Análisis del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Laboratorio de Diagnostico Veterinario y Control de Calidad del Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Laboratorios de Fundación Salvadoreña para investigaciones del café.
(PROCAFE)
- Laboratorios del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria (CENTA).
- Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC).
- Laboratorios de Calidad Integral, de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social. (FUSADES).

- Instituto de Investigaciones y Desarrollo Químico Biológico (IQB)
- Centro de Control de Calidad Industrial (CCCI).
- Laboratorios de Control de Calidad de Lactosa S.A. de CV.
- Laboratorios de Control de Calidad de Foremost S.A. de CV.
- Laboratorios de Control de Calidad de La Salud S.A. de CV.
- Laboratorios de Control de Calidad de las Industrias Lácteas EL Jobo S.A de C.V.

4.3.1. Recolección de datos

Universidad de El Salvador

Facultad de Química y Farmacia

Departamento de Bromatología y Toxicología

Encuestas realizadas a Laboratorios de Control de Calidad de Alimentos

- **1. Nombre del Laboratorio: Laboratorio de Análisis del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.**
- Profesional entrevistado: LIC. REINA JOVEL COSME DE RODRÍGUEZ.
- Cargo que desempeña: COORDINADORA DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGÍA.
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- SI
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO
- ¿Qué metodología se emplea para el análisis de Fosfatasa Alcalina en el laboratorio? METODO DE SCHARER
- ¿Es el análisis de Fosfatasa alcalina solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- NO

ESTA DEBE SER UNA PRUEBA DE LA QUE SE ENCARGUE AGRICULTURA, YA QUE EN EL MSPAS, ESTAMOS DESIGNADOS POR EL CÓDIGO DE SALUD PARA LA VIGILANCIA DE LA

INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. PERO SON EL FABRICANTE, EL CONACYT Y EL MINISTERIO DE ECONOMÍA QUIENES DEBEN VELAR POR QUE LA CALIDAD DE FABRICACIÓN DEL PRODUCTO SEA INOCUA. Y ESTA PRUEBA DEBE REALIZARSE EN PRODUCTO AUN EN PROCESAMIENTO NO EN PRODUCTO TERMINADO.

- ¿Es el análisis de Lactoperoxidasa solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- NO, Y NO SE REALIZA.
- ¿Qué ventajas presenta el método utilizado para el análisis químico de Fosfatasa?
- NO TIENE SENTIDO REALIZARLO EN PRODUCTO TERMINADO Y PUESTO EN ESTANTERÍA PARA SU EXPENDIO.

2. Nombre del Laboratorio: Laboratorio de Diagnostico Veterinario y Control de Calidad del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

- Profesional entrevistado: INGENIERO PARADA.
- Cargo que desempeña: JEFE DIRECTOR DE LA DIVISIÓN INOCUIDAD DE ALIMENTOS
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- SI
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO

- ¿Qué metodología se emplea para el análisis de Fosfatasa Alcalina en el laboratorio? METODO FLOURIMETRICO
- ¿Es el análisis de Fosfatasa alcalina solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- SE REALIZA LA PRUEBA CUANDO LA NSO ASÍ LO INDICAN Y ESTO DEPENDE DEL TIPO DE PRODUCTO A ANALIZAR, SE LE REALIZA O NO SEGÚN LOS REQUERIMIENTOS DE CADA NORMA SALVADOREÑA OBLIGATORIA. ESTE ANÁLISIS ES LLEVADO A CABO MENSUALMENTE.
- LAS MUESTRAS TOMADAS DE LAS EMPRESAS LÁCTEAS POR MEDIO DE LOS INSPECTORES DEL MINISTERIO DE MANERA ALEATORIA, SON LLEVADAS A CABO MEDIANTE UN MUESTREO PROGRAMADO ANUALMENTE PARA DARLE COBERTURA AL NÚMERO DE EMPRESAS LÁCTEAS DEL PAÍS. LAS PRUEBAS QUE GENERALMENTE SE LE REALIZAN A LOS PRODUCTOS LÁCTEOS EN ESTE LABORATORIO SON:
 - PRUEBA DEL ANILLO DE VAN (BRUCELOSIS), PORCENTAJE DE GRASA, AGUADO, PUNTO CRIOSCÓPICO, ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS: COLIFORMES FECALES, ESTAFILOCOCO E. COLI, RECUENTO TOTAL.
 - LOS LÁCTEOS QUE SE ELABORAN ARTESANALMENTE Y SE EXPENDE EN LOS MERCADOS NO SON MUESTREADOS POR ESTE

LABORATORIO DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA
SINO QUE DE ESTO SE ENCARGA EL LABORATORIO DEL
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL.

- EL MAG BRINDA A ESTOS PRODUCTORES ARTESANALES EL ACOMPAÑAMIENTO EN ASESORÍA Y ASISTENCIA TÉCNICA EN BUENAS PRACTICAS DE PRODUCCIÓN.
- ¿Es el análisis de Lactoperoxidasa solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿con cuánta frecuencia se realiza?
- NO, Y NO SE REALIZA.
- ¿Qué ventajas presenta el método utilizado para el análisis químico de Fosfatasa? EL MÉTODO FLOURIMÉTRICO CON EL CUAL CUENTA EL LABORATORIO DEL MAG CONSISTE EN UN KIT DE REACTIVOS Y EQUIPO COMPLEMENTARIO CON EL CUAL SE ANALIZA LA EFICIENCIA DE PASTEURIZACIÓN, A LAS MUESTRAS QUE REQUIERAN LA PRUEBA.

3. Nombre del Laboratorio: Laboratorios de Calidad Integral FUSADES

- Profesional entrevistado: LIC. ANA MIRIAN UMAÑA.
- Cargo que desempeña: TÉCNICO ANALISTA.
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- Si

- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- No
- ¿Qué metodología se emplea para el análisis de Fosfatasa Alcalina en el laboratorio? MÉTODO DE SCHARER.
- ¿Es el análisis de Fosfatasa Alcalina solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- NO SE SOLICITA CON FRECUENCIA.
- ¿Es el análisis de Lactoperoxidasa solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- NO SE REALIZA
- ¿Qué ventajas presenta el método utilizado para el análisis químico de Fosfatasa? LA PRUEBA PUEDE REALIZARSE EL MISMO DÍA Y ES BASTANTE CONFIABLE.

4. Nombre del Laboratorio: Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC).

- Profesional entrevistado: DRA. ELIZABETH VANEGAS DE SALAZAR.
- Cargo que desempeña: DIRECTORA GENERAL.
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- SI
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO

- ¿Qué metodología se emplea para el análisis de Fosfatasa Alcalina en el laboratorio? METODO DE SCHARER
- ¿Es el análisis de Fosfatasa alcalina solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- NO
- NO ES MUY SOLICITADO.
- ¿Es el análisis de Lactoperoxidasa solicitado con frecuencia en este laboratorio? Si lo es, ¿Con cuánta frecuencia se realiza?
- NO

5. Nombre del Laboratorio: Instituto de Investigaciones y Desarrollo Químico Biológico (IQB)

- Profesional entrevistado: LIC. MARIO GONZÁLEZ
- Cargo que desempeña: DIRECTOR TÉCNICO DEL LABORATORIO.
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- NO
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO
- NO SE REALIZAN ESTOS ANÁLISIS PUES NO SE CUENTA CON LABORATORIO DE ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y SE ESPECIALIZAN MÁS EN EL ÁREA MICROBIOLÓGICA.

6. Nombre del Laboratorio: Centro de Control de Calidad Industrial (CCCI).

- Profesional entrevistado: LIC. LETICIA GIRÓN
- Cargo que desempeña: DIRECTORA DE CALIDAD.
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- NO
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO.
- EL LABORATORIO SE ESPECIALIZA EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.

7. Nombre del Laboratorio: Laboratorios de Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria (CENTA).

- Profesional entrevistado: LIC. LUIS REYES VALIENTE.
- Cargo que desempeña: ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- NO
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO. SOLO SE REALIZAN ANÁLISIS DE MATERIAS INORGÁNICAS EN SUELOS.

8. Nombre del Laboratorio: Laboratorios de Fundación Salvadoreña para investigaciones del café (PROCAFE).

- Profesional entrevistado: LIC. REYNA FUNES DE CRUZ.
- Cargo que desempeña: ENCARGADA DE ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO.
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Fosfatasa en leche y quesos?:
- NO
- ¿Realiza el Laboratorio análisis de Lactoperoxidasa en leche y quesos?
- NO
- SOLO SE REALIZAN ANÁLISIS DE MATERIA ORGÁNICA EN VEGETALES.

Universidad de El Salvador
Facultad de Química y Farmacia
Departamento de Bromatología y Toxicología
Encuestas realizadas a Industrias Productoras de Lácteos

1. Nombre de la Empresa Láctea: LACTOSA S.A. DE CV.
 - Nombre del Profesional entrevistado: LICDA. HERMINIA DE LUNA.
 - Cargo que desempeña: JEFE DE CONTROL DE CALIDAD DE LACTOSA.
 - ¿Qué pruebas y análisis químicos biológicos se le realizan a la leche en procesamiento y como producto, como parte del aseguramiento de la calidad? REDUCTASA, ACIDEZ, PUNTO CRIOSCOPICO, PH, SÓLIDOS TOTALES, PORCENTAJE DE GRASA; DEPENDIENDO SI ES LECHE FLUIDA O PROCESADA, SE REALIZAN DIFERENTES PRUEBAS FÍSICO QUÍMICAS.
 - ¿Se realizan a las leches algún análisis para determinar Fosfatasa alcalina o Lactoperoxidasa? ¿Por que? NO, PORQUE LO REALIZA EL MAG.
 - ¿Con que frecuencia se realizan controles de calidad al proceso de pasteurización o de esterilización de la leche? CADA MES, POR EL MAG.

- ¿Qué metodología de análisis químico emplean para garantizar la eficacia del proceso térmico en las leches? PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

2. Nombre de la Empresa Láctea: INDUSTRIAS LÁCTEAS EL JOBO

- Nombre del Profesional entrevistado: ING. MORENA GUEVARA
- Cargo que desempeña: TÉCNICO DE CONTROL DE CALIDAD.
- ¿Qué pruebas y análisis químicos biológicos se le realizan a la leche en procesamiento y como producto, como parte del aseguramiento de la calidad? ACIDEZ TITULABLE, PORCENTAJE DE GRASA, REDUCTASA, Y PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS, DEPENDIENDO DEL PRODUCTO.
- ¿Se realizan a las leches algún análisis para determinar Fosfatasa alcalina o Lactoperoxidasa? ¿Por que? NO. LAS PRUEBAS DE PASTEURIZACIÓN LAS REALIZA EL MAG.
- ¿Con que frecuencia se realizan controles de calidad al proceso de pasteurización o de esterilización de la leche? MES A MES.
- ¿Qué metodología de análisis químico emplean para garantizar la eficacia del proceso térmico en las leches? EN PLANTA: PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

3. Nombre de la Empresa Láctea: LA SALUD S.A. DE CV.

- Nombre del Profesional entrevistado: ING. GUILLERMO BARAHONA.
- Cargo que desempeña: JEFE DE CONTROL DE CALIDAD DE LA SALUD.

- ¿Qué pruebas y análisis químicos biológicos se le realizan a la leche en procesamiento y como producto, como parte del aseguramiento de la calidad?

ACIDEZ, AGUADO (PUNTO CRIOSCÓPICO), PH, SÓLIDOS TOTALES, PORCENTAJE DE GRASA; REDUCTASA.

- ¿Se realizan a las leches algún análisis para determinar Fosfatasa alcalina o Lactoperoxidasa? ¿Por que?

NO EN LA PLANTA, PERO SI SE LE REALIZA A TRAVÉS DEL MAG.

- ¿Con que frecuencia se realizan controles de calidad al proceso de pasteurización o de esterilización de la leche?

CADA MES, MUESTREADO POR LOS INSPECTORES DEL MAG.

- ¿Qué metodología de análisis químico emplean para garantizar la eficacia del proceso térmico en las leches?

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

4. Nombre de la Empresa Láctea: FOREMOST S.A. DE CV.
- Nombre del Profesional entrevistado: ING. GUTIÉRREZ.
 - Cargo que desempeña: JEFE DE CONTROL DE CALIDAD DE FOREMOST.
 - ¿Qué pruebas y análisis químicos biológicos se le realizan a la leche en procesamiento y como producto, como parte del aseguramiento de la calidad? PH, SÓLIDOS TOTALES, PORCENTAJE DE GRASA; ACIDEZ, REDUCTASA, ACIDEZ, PUNTO CRIOSCOPICO.
 - ¿Se realizan a las leches algún análisis para determinar Fosfatasa alcalina o Lactoperoxidasa? ¿Por que?
 - SI EL MAG, LO REALIZA.
 - ¿Con que frecuencia se realizan controles de calidad al proceso de pasteurización o de esterilización de la leche? CADA MES, EL MINISTERIO MUESTREA LOS PRODUCTOS PARA ANALIZARLOS.
 - ¿Qué metodología de análisis químico emplean para garantizar la eficacia del proceso térmico en las leches?
 - ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

4.3.2. Análisis de Datos.

En el país, la entidad encargada de verificar la pasteurización en leches industrializadas es el MAG a través del Laboratorio de Diagnostico Veterinario y Control de Calidad empleando el Método Fluorimétrico para Fosfatasa Alcalina Residual. Dicho método es aplicable a muestras de la planta procesadora, y no para muestras de producto en el mercado como lo menciona la responsable del Laboratorio de Análisis del MSPAS. No se realizan pruebas para Lactoperoxidasa para Leches UHT, ya que la Norma Obligatoria Salvadoreña no lo contempla.

Las leches crudas y los productos lácteos elaborados artesanalmente, no son analizados por estas entidades, sin embargo, el MAG brinda asesoría de acompañamiento a estos productores y el MSPAS es designado, según el Código de Salud a la vigilancia de la inocuidad de los alimentos.

Los productores industrializados no realizan pruebas internas en planta para verificar los procesos de pasteurización o ultra pasteurización sea eficiente, dejándolo a los Inspectores Sanitarios del MSPAS.

CAPITULO V
RESULTADOS

5.0 RESULTADOS

- En el país los métodos para la comprobación del procesamiento térmico efectivo en la leche y queso, son únicamente aquellos en el que se determina la presencia de la enzima fosfatasa alcalina residual sin diferenciar la fosfatasa alcalina reactivada. Esto a través de dos métodos: el método rápido de Scharer y el método flourimétrico.

- En el país se comprueba la efectividad de los procesos térmicos en los lácteos a temperaturas ultra altas a través de los análisis microbiológicos y no se realizan análisis para determinar lactoperoxidasa ni se verifica el sobrecalentamiento.

- Se presentan nueve métodos de análisis químicos más empleados según la bibliografía, para determinar Fosfatasa alcalina láctea tanto residual como reactivada y cuatro métodos para determinar Lactoperoxidasa en lácteos.

Métodos para determinar Fosfatasa alcalina:
1. Prueba rápida para Fosfatasa por Método de Scharer.
2. Método Espectrofotométrico modificado
3. Método de Cornell
4. Método de Rutgers

5. Método de Aschaffenburg y Mullen
6. Método de Sanders y Sager Modificado
7. Prueba con 4-aminofenazona
8. Método Fluorimétrico
9. Método para determinar Fosfatasa alcalina reactivada
Métodos para Determinar Lactoperoxidasa:
1. Reacción de Dupoy
2. Método de Storch
3. Método de Rothenfusser
4. Método ABTS [Acido 2,2'-azino- bis(3-etil-benzotiazolin) 6-sulfónico]

- El actual método de análisis para Fosfatasa alcalina empleado por el Laboratorio del Ministerio de Agricultura y Ganadería, es el Método Fluorimétrico, que únicamente se aplica para leches pasteurizadas y cabe mencionar que es para Fosfatasa alcalina residual.

- Las metodologías de análisis para fosfatasa alcalina residual y reactivada se basan en la actividad de la enzima que hidroliza al grupo hidroxilo de los esterres (sustratos).

- Las metodologías para la determinación de Lactoperoxidasa se fundamentan en la transferencia de oxígeno del peróxido de hidrógeno y así oxidar compuestos con estructuras aromáticas.
- En los métodos tanto para la determinación de Fosfatasa alcalina láctea residual y reactivada como para Lactoperoxidasa, se presenta metodología cualitativa y cuantitativa. Algunas de dichas reacciones pueden evidenciarse espectroscópicamente.
- Algunos de los reactivos que se emplean para determinar Fosfatasa alcalina residual, reactivada y Lactoperoxidasa como: la p-fenilendiamina, dietanolamina, butanol, metanol, p- nitrofenol, fenol e hidróxido de sodio son sustancias nocivas, tóxicas a la salud o son poco amigables con el medio ambiente.

CAPITULO VI
DISCUSION DE RESULTADOS

6.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- La necesidad de tener la certeza y seguridad de que los procesos de elaboración de un producto alimenticio se lleven a cabo con eficiencia e inocuidad, es vital no sólo para el consumidor sino también para los productores que deben competir cada vez más en mercados internacionales con altos estándares de calidad. Debido a lo anterior, los estudios de enzimas como la Fosfatasa alcalina residual, reactivada y la Lactoperoxidasa deberían ser implementados en el país a través de análisis para verificar la efectividad de los procesamientos caloríficos en las leches pasteurizadas que están en estantería y las sometidas a procesamiento UHT, las cuales últimamente han aumentado su presencia en el mercado nacional.
- Las metodologías que a nivel nacional emplean los laboratorios especializados en el control de calidad de alimentos para determinar la efectividad de los procesos térmicos a los que se someten las leches se basan en la determinación de la enzima Fosfatasa alcalina residual llevada a cabo en planta, no para producto terminado.

- El método flourimétrico que en la actualidad el laboratorio del MAG emplea, es para verificar la pasteurización de lácteos muestreados en la planta procesadora y determinar Fosfatasa alcalina residual.
- Este método es para verificar pasteurización y no para verificar la efectividad de tratamientos como los procesos HTST y UHT que cada vez más se emplean en las industrias lácteas del país, y los métodos de análisis para Fosfatasa alcalina que se emplean en el país no funcionan para leches en anaquel dentro del mercado que han sido pasteurizadas con dichos procesos, debido a que la enzima tiende a reactivarse.
- Las metodologías presentadas tanto para el análisis de Fosfatasa alcalina residual, reactivada y lactoperoxidasa presentan algunas ventajas al implementarlas, por su procedimiento sencillo y rápido si se dispone de todos los reactivos y sustratos que se requieren en estas metodologías, pero debe considerarse que algunos de los reactivos que se emplean pueden representar peligro a la salud y resultar no muy amigables con el ambiente.
- Es necesario considerar la siguiente tabla de aplicación de métodos en todo estudio de mercado, solo en ese caso y no para muestreos en planta procesadora pues resultaría innecesario.

APLICACIÓN DE METODOS

Muestra	Prueba Fosfatasa alcalina Residual	Prueba Fosfatasa alcalina reactivada	Interpretación	Acción a tomar por el MSPAS
Leche con pasteurización deficiente obtenida en anaquel	+	-	Presencia de fosfatasa residual	Llamar la atención y amerita sanción
Leche con pasteurización eficiente obtenida en anaquel	+	+	Presencia de fosfatasa reactivada	Ninguna. Producto no de baja calidad pero sobrecalentada
Leche con pasteurización deficiente obtenida en planta procesadora	+	-	Presencia de fosfatasa residual	Llamar la atención y amerita sanción

- La toma de Muestras es llevada a cabo por los Inspectores sanitarios del IPOA los cuales toman las muestras de la planta procesadora de manera aleatoria, y entregan las muestras en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario y Control de Calidad del Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- La entidad encargada de regular y normar los procesos de producción de alimentos es el CONACYT y La Cámara de Comercio e Industria de El Salvador.

- El ente facultado para hacer cumplir las normativas y sancionar aquellos casos en los que se incumplen las normas establecidas por el CONACYT es el MSPAS, designado así por el Código de Salud.

- Las pruebas de Fosfatasa alcalina residual son aplicables para conocer si un productor procesa la leche a una temperatura menor a la de una pasteurización normal. Su producto resultará positivo a la prueba de Fosfatasa alcalina residual si ha existido un mal procesamiento térmico.

- La prueba para determinar Fosfatasa alcalina reactivada puede aplicarse para conocer si el productor procesa la leche a una temperatura mayor a la de una pasteurización normal. Si este emplea un tipo de pasteurización HTST su producto resulta positivo a la prueba de Fosfatasa alcalina residual debido a una reactivación de la enzima. El método para Fosfatasa alcalina reactivada, nos asegura que la leche no ha sido mal pasteurizada y nos permite aclarar malas interpretaciones.

- En el caso que un productor procesó la leche a una temperatura Ultra alta (proceso UHT), no resulta útil aplicar la prueba de Fosfatasa alcalina residual debido a que la enzima se reactiva ante dicho procesamiento.

- Si se aplican estas metodologías para Fosfatasa alcalina residual y reactivada a nivel de planta procesadora únicamente se encontrará presente la Fosfatasa alcalina residual.
- La verificación de la eficiencia de las pasteurizaciones HTST y Ultra pasteurizaciones, no está siendo determinada a través de una prueba específica como las pruebas para determinar Lactoperoxidasa.
- En la actualidad los procesos UHT son respaldados con los resultados de análisis microbiológicos realizados a las leches. Por lo que es necesario implementar este tipo de pruebas específicas.
- Las pruebas de Lactoperoxidasa, son determinantes para verificar que los procesos térmicos a más de 82°C son efectivos, así como también son importantes para conocer si la leche ha sido sobrecalentada.
- El método de Trinder para Lactoperoxidasa (Ver Anexo N° 17) esta dado para glucosa y sacarosa en alimentos como los jugos de frutas, así también el método se presenta para la determinación de glucosa en fluidos biológicos, y no específicamente para leche. Este método podría ser estandarizado en futuros estudios para lácteos.

CAPITULO VII
CONCLUSIONES

7.0 CONCLUSIONES

1. En el país no se realizan análisis de verificación para Fosfatasa alcalina reactivada y tampoco se estudia la Lactoperoxidasa en leches UHT, la cual a nivel internacional es considerada para el análisis de ese tipo de leches.
2. En el país se determinar la eficacia del calentamiento UHT en leches, a través de pruebas microbiológicas donde no se considera el emplear la enzima específica Lactoperoxidasa.
3. Las leches con procesos de pasteurización HTST o UHT, presentan el inconveniente de la reactivación de la enzima Fosfatasa, lo cual siempre puede generar incertidumbre al interpretar los resultados obtenidos en los análisis para Fosfatasa alcalina residual.
4. Los métodos de análisis empleados actualmente en el país para verificar la existencia de Fosfatasa alcalina láctea, no especifican la derivación de la enzima, si ésta es residual o reactivada.
5. La enzima Lactoperoxidasa no está considerada como parte de los análisis requeridos en la Norma Obligatoria Salvadoreña NSO 67.01.15:07 Productos Lácteos. Leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas con sabor. Especificaciones.

6. El método Flourimétrico actualmente empleado en los laboratorios gubernamentales es un método muy adecuado, así también la prueba de 4- Aminoantipirina para determinar la enzima Fosfatasa alcalina residual.
7. Para estudios en mercado el emplear cualquiera de estos dos métodos Flourimétrico o 4- Aminoantipirina con el método de determinación con Fosfatasa alcalina reactivada permitiría descartar toda posibilidad de reactivación de la enzima y verificar el proceso térmico de las leches pasteurizadas con procesos HTST y UHT.
8. El método de Trinder, y el método con la 4- Aminoantipirina emplean en común la 4- Aminoantipirina y el fenol, lo cual podría ser ventajoso, ya que con un mismo reactivo podrían determinarse ambas enzimas.
9. Pese a los peligros que algunos métodos conllevan, la implementación de un método apropiado sigue siendo de gran importancia, y un requerimiento dentro de los estándares de calidad para el comercio nacional e internacional y sugerido en los libros oficiales.

CAPITULO VIII
RECOMENDACIONES

8.0 RECOMENDACIONES

1. Que en los métodos que se empleen para verificar procesos de pasteurización y ultra pasteurización se considere el emplear metodologías para Fosfatasa alcalina reactivada y Lactoperoxidasa, presentadas en esta investigación.
2. Que el Ministerio de Agricultura y Ganadería y el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, encargados de la vigilancia sanitaria de productos alimenticios como los lácteos, implementen metodologías de análisis químico-instrumental que permitan para muestras en estantería la comprobación de un procesamiento de pasteurización o de ultra pasteurización eficiente.
3. Que se implemente la prueba cualitativa de Dupoy para la identificar la enzima Lactoperoxidasa en leches con pasteurización HTST y las leches UHT, que permita verificar la efectividad del proceso y garantice que la leche no ha sido expuesta a sobrecalentamiento.
4. Que en los laboratorios gubernamentales pueda emplearse el método cuantitativo y espectrofotométrico: ABTS para la determinación de la enzima Lactoperoxidasa en leches con procesamiento UHT, que permita

verificar la efectividad del proceso y garantice que la leche no ha sido expuesta a sobrecalentamiento.

5. Que la Norma Obligatoria Salvadoreña NSO 67.01.15:07 Productos Lácteos. Leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas con sabor. Especificaciones; considere el incluir las pruebas para determinar Lactoperoxidasa en leches UHT.
6. Que la Norma Obligatoria Salvadoreña NSO 67.01.15:07 Productos Lácteos. Leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas con sabor. Especificaciones; considere el incluir la prueba para determinar Fosfatasa alcalina láctea reactivada, para estudios en el comercio.
7. Que en futuras investigaciones se retome el método de 4- Aminoantipirina para determinar Fosfatasa alcalina y se verifique si este puede ser empleado también con ciertas variantes a la determinación de la enzima Lactoperoxidasa, ya que la 4- Aminoantipirina no está catalogada como sustancia peligrosa a la salud, reduciendo así el manejo de sustancias con alta toxicidad y cancerígenos.
8. Dar a conocer este trabajo de graduación a las Instituciones relacionadas.

9. Aplicar métodos para fosfatasa alcalina residual y reactivada en todo estudio de mercado que se realice para evitar falsos- positivos en los resultados.
10. Que la Norma Obligatoria Salvadoreña NSO 67.01.15:07 Productos Lácteos. Leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas con sabor. Especificaciones; sea retomada para una revisión, enfocada a la implementación de algunos de los métodos para Lactoperoxidasa.
11. Que los métodos amigables con el ambiente y no cancerígenos, cuantitativos y cualitativos recomendados para Fosfatasa alcalina son: el Método Flourimétrico, el método con 4- Aminoantipirina y el Método de Rutgers.
12. Que los métodos amigables con el ambiente y no cancerígenos, cuantitativos y cualitativos recomendados para Lactoperoxidasa: el Método ABTS, el Método de Trinder y la Prueba de Dupoy.
13. A los proveedores de reactivos se recomienda realizar esfuerzos en la importación de reactivos para las determinaciones de Fosfatasa alcalina y Lactoperoxidasa que sean amigables con el ambiente, como los empleados en los métodos antes recomendados.

BIBLIOGRAFIA

1. Badui Dergal, Salvador. Química de los alimentos. Editorial Alambra Mexicana. México.1982.
2. Benitez, Santos. “Determinación de la calidad microbiológica y fisicoquímica de leche de recibo en una planta procesadora de lácteos del área de San Salvador”.Universidad “Alberto Masferrer”. Julio 2002.
3. Brock T D. Madigan M.T. Microbiología. 6^{ta} Edición. Editorial Prentice Hall. México.1993.
4. Charley Helen. Tecnología de alimentos. Editorial Limusa. Mexico, 2004.
5. FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud). Codex Alimentarius. Volumen XVI “Código de principios referentes a la leche y los productos lácteos, normas internacionales para los productos lácteos y normas internacionales para los quesos. Primera edición. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Italia. 1986.

6. MSPAS/OPS/OMS (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social/ Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud). Código de Salud. Departamento de Saneamiento Ambiental del MSPAS. Con las últimas reformas hasta el 27 de marzo de 1996 Tomado del Diario Oficial Tomo 299 Num. 86. Miércoles 11 Mayo de 1988. S.S., E.S., C.A.
7. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). 1995. "Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:95: Queso no Madurado. Especificaciones"; San Salvador, El Salvador. Pág. 1-6.
8. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). 1996. "Norma Salvadoreña NSO 67.01.01:96: Leche Cruda de Vaca"; San Salvador, El Salvador. Pág. 1-3.
9. Demeter, Kr. Elementos de microbiología lactológica. 6^{ta} Edición. Editorial Acribia. España. 1971.
10. Microsoft Corporation. Diccionario de la Real Academia Española versión digital para Microsoft Encarta. 2004.

11. Microsoft Corporation. Diccionario Ingles- Español versión digital para Microsoft Encarta. 2004.
12. Elmer H. Marth. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14^a Edition. American Public Health Association. USA. 1978.
13. Escoto Solís, A C y otros. Junio 2000. "Determinación de Fosfatasa por el método rápido de Scharer en quesillos que se comercializan en el municipio de San Salvador". Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador.
14. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Manual de control de la Calidad de los Alimentos para la exportación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma 1991.
15. Secretaria de Salud Mexicana. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo I. 7^a Edición. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. México. 2000.
16. Fox Cameron. Ciencia de los alimentos. Editorial Limusa. Mexico. 1992.

17. Gary D. C. Química Analítica. 2ª Edición Editorial Limusa. México. 1988.
18. Kirk, R; Othmer, D. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial Hispanoamericana. Tomos 5; 7 y 10. México. 1962.
19. Luquet F.M. Leche y productos lácteos. La leche de la mamá a la lechería. Volumen 1 .2ª Edición. Editorial Acribia. España. 1991.
20. Luquet F.M. Leche y productos lácteos. Los productos lácteos. Transformaciones y tecnologías. Volumen 2 .2ª Edición. Editorial Acribia. España. 1991.
21. Martínez Ortiz, H. A. y otros. Abril 2004. "Determinación de la calidad de leches crudas y quesillos elaborados artesanalmente en plantas productoras de lácteos del área metropolitana de San Salvador". Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador.
22. Maynard A. Joslyn. Food Science and Technology. A series of monographs. Methods on Food Analysis. Physical, Chemical, and Instrumental methods of analysis. 2nd Edition. Capítulo XXIII. Enzyme essay. Editorial Borrada. USA. 1970.

23. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos. Secretaria General de Alimentos. Dirección General de Política Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Tomo IV. Madrid 1994.

24. Ministerio de Agricultura. Métodos Oficiales de Análisis de Productos Lácteos. Madrid, España, 1974.

25. Morales Henríquez F. Procesos en la industria lechera. Memorias del Primer Congreso Nacional de Inspección de Productos de Origen Animal. IPOA, CDG y MAG. Octubre 1991.

26. Morales Henríquez, F. Contaminaciones en los procesos de la industria lechera. Memorias del Primer Congreso Nacional de Inspección de Productos de Origen Animal. IPOA, CDG y MAG. Octubre 1991.

27. Muñoz de Arevilla J. R. Lactología Industrial. 2ª Edición. Editorial Acribia. España. 1975.

28. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. AOAC.14th edition. USA. 1984.

29. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. AOAC. USA. 1995.
30. Ortiz G. Generalidades de la leche y su composición. Memorias del Primer Congreso Nacional de Inspección de Productos de Origen Animal. IPOA, CDG y MAG. Octubre 1991.
31. Owen R. Fennema. Química de los alimentos. 2ª edición. Editorial Acribia. España. 2000.
32. Pearson. Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Tomo 2. Editorial Continental. México. 1987.
33. Porter J. W. G. Leche y productos lácteos. Editorial Acribia. España. 1981.
34. Potter, N. La Ciencia de los Alimentos. Edutex. S.A. México, 1973.
35. Programa conjunto FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud) sobre Normas Alimentarias. Comité mixto FAO/OMS de expertos gubernamentales sobre el código de principios referentes a la leche y los

36. productos lácteos. Informe del vigésimo segundo período de sesiones Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación OMS. Roma. 1990.
37. S. Martin, Erick, Cook, F, Fullerton. Remington Pharmaceutical Sciences. RPS-15 15ª Edition. Editorial Board Members. Pensilvania. 1975.
38. Santos Moreno A. leche y sus derivados. Editorial Trillas. México. 1996.
39. Scott, R. Fabricación de queso. 2ª Edición. Editorial Acribia. España. 2002.
40. Varnam Alan H. Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia. España. 1995.
41. Veisseyre R. Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. 2ª Edición. Editorial Acribia. España. 1980.
42. Walstra P. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia. España. 2001.

43. Zehren V. L. Manual tecnología quesera. AID (Agencia Internacional para el Desarrollo) por LATU (Laboratorio Tecnológico Uruguayo) Uruguay. 1979.
44. Alais Charles, Antonio Lacasa Godina. Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera. 4^{ta} Edición, ilustrado. Editorial Reverté, Mexico.1985. Disponible en línea en : <http://books.google.com.sv/>
45. http://images.google.com.sv/imgres?imgurl=http://www.catallix.com/image/sc_molec.gif&imgrefurl=http://www.catallix.com/sp/cx_tec_d.html&h=304&w=257&sz=19&hl=es&start=1&um=1&tbnid=VCh9rc-_mPR_zM:&tbnh=116&tbnw=98&prev=/images%3Fq%3DMOLECULA%2BLACTOPEROXIDASA%26gbv%3D2%26um%3D1%26hl%3Des%26sa%3DG . Imágenes de molécula de lactoperoxidasa. Consultado en Marzo 2008. Disponible en línea.
46. <http://images.google.com.sv/imgres?imgurl=http://www.maph49.galeon.com/biomol2/alkpase8.gif&imgrefurl=http://www.maph49.galeon.com/biomol2/tertiary.html&h=201&w=240&sz=56&hl=es&start=2&tbnid=ns-srN9mpvdK8M:&tbnh=92&tbnw=110&prev=/images%3Fq%3DESTRUCTUR%2BFOSFATAS%26gbv%3D2%26hl%3Des%26sa%3DG> . Imágenes

47. de molécula de fosfatasa alcalina. Consultado en Marzo 2008. Disponible en línea.
48. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte08/02.html. Determinación de Fosfatasa alcalina en lácteos. Sistema bibliotecario de la universidad de chile. Consultado en Feb. 2008. Disponible en línea.
49. <http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN110e.pdf> . Estudio objetivo sobre la pasteurización de la leche de desecho. Universidad de Wisconsin. USA. Abril 2005. Consultado el Marzo 2008. Disponible en línea.
50. <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/VeterinariaTropical/vt2102/texto/mrampilli.htm> . Estudio comparativo de dos métodos para la determinación de lactoperoxidasa, por: Marco Rampilla; y Nancy López; Maracay, Venezuela. Enero 1996. Consultado en Marzo 2008. Disponible en línea.
51. http://www.nacersano.org/centro/9388_9916.asp. Centro de enseñanza del embarazo. Biblioteca de salud en línea. Consultado el 23 de marzo 2007 Disponible en línea.

52. http://www.otispregnancy.org/pdf/Listeriosis_y_Embarazo.pdf. Listeriosis y Embarazo. OTIS. Organization of Teratology Information Services. Dic 2001. Disponible en línea.
53. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/lactoperoxidase_abts_substrate.Par.0001.File.tmp/lactoperoxidase_abts_substrate.pdf. Ensayo enzimático de Lactoperoxidasa empleando como sustrato el ácido 2,2' azino-bis(3-etil-benzotiazolin)-6-sulfónico. Febrero 2009. Disponible en línea en idioma inglés.
54. http://www.upload_wikimedia_org-wikipedia-commons-1-1f-ABTS_png_archivos. Estructura química del ABTS. Febrero 2009. Disponible en línea.
55. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=ES2006000489&DISPLAY=DESC>. C. Aminoácido tipo Micosporina (M-GLY) como Antioxidante. Enero 2009. Disponible en línea.
56. www.chilealimentos.com/.../INN/Consulta_Publica/Determinacion_actividad_fosfatasa_alcalina.pdf. Proyecto de Norma Chilena para leche y productos lácteos en consulta pública: Determinación de actividad de

57. fosfatasa alcalina- Parte 1: método fluorimétrico para leche y bebidas en base a leche. INN. Consultado en Nov. 2006. Disponible en línea.
58. www.qo.fcen.uba.ar/Cursos/Tecnoll/guia.pdf. Guía de trabajos prácticos- Laboratorio. Licenciatura en Ciencia y tecnología de alimentos. Ingeniería en alimentos. Facultad de Ciencias exactas y naturales. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Bromatología. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 2007. Disponible en línea.
59. <http://www.wikimedia.com>. Enciclopedia Virtual. Consultada en Mayo 2009. Disponible en línea.
60. <http://www.cdc.gov/niosh/topic/cancer/npotocca.html>. Listado de sustancias cancerígenas del Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH, siglas del inglés). Consultado en Julio 2009. Disponible en línea en idioma inglés.
61. http://www.state.nj.us/health/eoh/odisweb/ca_hsf.html. Hojas de Datos de Sustancias peligrosas del Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey. (New Jersey Department of Health and Seniors Services) Consultado en Junio de 2009. Disponible en línea en idioma inglés.

62. <http://www.fichasinternacionalesdeseguridadquimica>. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Consultado en Agosto de 2009 Disponible en línea.

GLOSARIO

Ácido glutámico: Es uno de los veinte aminoácidos esenciales que forman parte de las proteínas. Desempeña un papel central en relación con los procesos de transaminación y en la síntesis de distintos aminoácidos que necesitan la formación previa de este ácido, como es el caso de la prolina, hidroxiprolina, ornitina y arginina.⁽⁵⁵⁾

Ácido siálico: o ácido N-acetilneuramínico es un monosacárido ácido derivado del ácido neuramínico (un compuesto base de 9 átomos de carbono) mediante acetilación. Es un componente importante de las glucoproteínas. ⁽⁵⁵⁾

Actividad lipasa: la actividad de la enzima lipasa de catalizar la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol. ⁽⁵⁵⁾

Apoenzima: Es la parte proteica de una enzima, desprovista de los cofactores o coenzimas que puedan ser necesarios para que la enzima sea funcionalmente activa. La apoenzima es catalíticamente inactiva; cuando se le une la coenzima o cofactor adecuados, constituye la holoenzima. ⁽¹⁰⁾

Brucelosis: Enfermedad infecciosa producida por bacterias del género *Brucella* y transmitida al hombre por los animales domésticos. ⁽¹⁰⁾

Cadaverina: ($C_5H_{14}N_2$), también conocida como 1,5-diaminopentano, pentametilendiamina, pentano-1,5-diamina es una diamina biogénica que se obtiene por la descomposición del aminoácido lisina. Se encuentra principalmente en la materia orgánica muerta, y es responsable en parte del fuerte olor a putrefacción. ⁽⁵⁵⁾

Calostro: Primera leche que da la hembra después de parida. Esta leche es de color amarillo rojizo y tiene olor fuerte y sabor amargo. (11)

Camembert: Queso de origen francés, de pasta blanda, untuosa y suave. (11)

Caseína: Proteína de la leche, rica en fósforo, que, junto con otros componentes de ella, forma la cuajada que se emplea para fabricar queso. (10)

Catálisis: Transformación química motivada por sustancias que no se alteran en el curso de la reacción. (10)

Centro activo: o sitio activo es el área de su estructura terciaria de una enzima y en ella ocurren las actividades o reacciones específicas con las moléculas de sustrato. (55)

Cisteína: La cisteína es un aminoácido no esencial, sulfurado, que puede oxidarse dando el dímero cistina. Se sintetiza a partir de la metionina. Su nombre sistemático es: Ácido 2-amino-3-mercaptopropiónico. (55)

Choque térmico: proceso que se genera en organismos unicelulares como pluricelulares, cuando se encuentran en un medio ambiente o en condiciones que le provoca cualquier tipo de estrés. (55)

Cofactor: Son partes no proteicas de una enzima y ayudan a regular la actividad enzimática y según su naturaleza química pueden ser cationes metálicos o coenzimas; moléculas orgánicas complejas. (10)

Coliformes: grupo de especies bacterianas entéricas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos. (10)

Coloide: Dispersión de partículas o macromoléculas en un medio continuo. (11)

Corrosivo: sustancia gaseosa, líquida o sólida que causa daño irreversible en el tejido humano o en el recipiente que la contiene. (53)

Cuajo: Fermento de la mucosa del estómago de los mamíferos en el período de lactancia, que coagula la caseína de la leche. (55)

Emulsión: Dispersión de un líquido en otro no miscible con él. La emulsión de aceite en agua. (11)

Enzima: Proteína que cataliza específicamente cada una de las reacciones bioquímicas del metabolismo. (10)

Fiambres: Se dice de la carne o del pescado que, después de asados o cocidos, se comen fríos, y también de la carne curada. (11)

Flavor: o sabor es la impresión sensorial de un alimento u otra sustancia, y esta determinada principalmente por las sensaciones químicas del gusto y el olfato. (55)

Filogenético: Pertenece o relativo a la filogenia. Parte de la biología que se ocupa de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos. (11)

Flora psicrófila: o psicrótrofos son microorganismos que prefieren el frío y se multiplican bien a temperaturas relativamente bajas (10-15 °C). (55)

Fosfolípidos: Sustancias grasas que contienen nitrógeno, ácido fosfórico y una base nitrogenada. (55)

Glicoproteína: O Glucoproteína. Proteína conjugada cuyos componentes no proteicos son hidratos de carbono; p. ej., las inmunoglobulinas. (55)

Grupo prostético: Fracción no proteica de una enzima. (10)

Glutation Peroxidasa: Enzima específica que cataliza al: glutatión, que es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. (55)

Glutation: Es el 2-amino-5-[[2-[(carboximetil)amino]-1-(mercaptometil)-2-oxoetil]amino]-5-ácido oxopentanoico, una γ -glutamilcisteinilglicina. Actúa reduciendo especies reactivas del oxígeno como peróxido de hidrógeno a través de la enzima glutatión peroxidasa. (55)

Hemo: El grupo hemo contiene hierro y un anillo de porfirina, es un tetrapirrol cíclico, el tetrapirrol está compuesto por 4 cadenas de pirrol enlazadas a un anillo, en el centro de este anillo se encuentra el átomo de hierro. Su función principal es la de almacenar y transportar oxígeno molecular. (55)

Hemoproteína: Proteína enzimática que tiene como cofactor un grupo hemo B (hierro-protoporfirina IX) unido covalentemente a través de enlaces tipo éster a grupos metilo hidroxilados. (55)

Holoenzima: Enzima que además de aminoácidos, presentan otra molécula no proteica en su composición. Un holoenzima está compuesto por una apoenzima (parte proteica) y un cofactor (parte no proteica). (55)

Inflamable: sustancia sólida, líquida, vapor o gas que puede ignited fácilmente y quemarse rápidamente. (53)

Lactoalbúmina: proteína que junto con la caseína y la lactoglobulina

constituye el contenido proteico más importante de la leche. (55)

Leche bronca: o leche cruda aquella que no ha recibido ningún tipo de tratamiento sanitario. (55)

Metastable: Sistema químico que posee estabilidad aparente por su pequeña velocidad de transformación. (10)

Microorganismos mesófilos: o termófilos microorganismos generalmente esporulados aeróbios prefieren temperaturas elevadas para su multiplicación entre 40-45 °C. (10)

Mutágeno: sustancia que causa mutaciones, cambios en el material genético de las células del cuerpo. Puede conllevar a defectos en nacimientos, pérdidas o cáncer. (53)

Ornitina: La ornitina es un aminoácido dibásico, sintetizado en las mitocondrias como producto del glutamato. Se forma por la acetilación de su grupo amino, fosforilación y reducción del derivado acetilado a N-acetilglutamico- γ -semialdehído. (55)

Oxidación: Cuando un compuesto reacciona con otra sustancia química perdiendo electrones o ganando oxígeno. (11)

Oxidorreducción: Reacción en la que intervienen un oxidante y un reductor, y en la cual se produce una reducción del primero y una oxidación del segundo. (11)

Pasteurizar: Elevar la temperatura de un alimento líquido a un nivel inferior al de su punto de ebullición durante un corto tiempo, enfriándolo después rápidamente, con el fin de destruir los microorganismos sin alterar la composición y cualidades del líquido. (11)

Patógeno: Que origina y desarrolla una enfermedad. (10)

Polipéptido: Molécula polímera formada por la unión, mediante enlaces peptídicos, de varias moléculas de aminoácidos. Su peso molecular es menor a 10000 A. (55)

Proteasas: enzima del grupo de las hidrolasas, generalmente con misiones digestivas, que es específica para las proteínas y de los pépticos. (55)

Proteido: Heteroproteína constituida por una proteína típica y un grupo prostético de naturaleza no proteínica. (10)

Pulverización: Reducir a polvo un sólido o a partículas muy tenues un cuerpo líquido. (11)

Roquefort: Queso de origen francés, fabricado con leche de oveja, de olor y sabor fuertes y color verdoso producido por un moho. (11)

Reactivo: sustancia sólida, líquida o gaseosa que libera energía bajo ciertas condiciones. (53)

Reactivación: Acción y efecto de reactivar. (10)

Reducción: Hacer que un compuesto gane electrones, como sucede en la eliminación parcial o total del oxígeno contenido. (11)

Salmuera: Agua cargada de sal. Agua que sueltan las cosas saladas. (11)

Selenoproteína: Proteína que posee como cofactor al Selenio. (55)

Sinéresis: Fenómeno físico consistente en la contracción espontánea de un gel con separación de parte del líquido que se encuentra en este. (11)

Standard Methods for the Examination of Dairy Products: Métodos Estandarizados para el Análisis de Productos Lácteos. (12)

Sustrato: Sustancia sobre la que actúa una enzima. (10)

Térmico: Pertenece o relativo al calor o la temperatura. Que conserva la temperatura. Material térmico. (10)

Teratógeno: sustancia que causa malformaciones de nacimiento por daño al feto. (53)

Triptófano: El triptófano es un aminoácido esencial, presente en los alimentos tales como los huevos y la leche. (55)

Tuberculosis: Enfermedad del hombre y de muchas especies animales producida por el bacilo de Koch. Adopta formas muy diferentes según el órgano atacado, la intensidad de la afección, etc. Su lesión habitual es un pequeño nódulo, de estructura especial, llamado tubérculo. (11)

Zoonosis: Enfermedad o infección que se da en los animales y que es transmisible al hombre en condiciones naturales. (11)

ANEXOS

**ANEXO N° 1. CUIDADOS QUE SE DEBEN TOMAR DURANTE EL
TRASLADO DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y QUESO.**

- El producto procesado se tomará en su envase original, cerrado y etiquetado.
- El producto artesanal o sin procesar se colocará dentro de una bolsa con cierre hermético.
- Los envases deberán ser cerrados inmediatamente después de haber depositado el producto para evitar la contaminación. Luego se colocaran en termos o hieleras limpias o provistas de hielo y se llevaran al laboratorio lo más pronto posible. (22)
- Evitar la contaminación durante el traslado por una ruptura de envase.
- Rotulación correcta y legible del producto.
- Identificación del producto.
- Mantener la temperatura de refrigeración durante el transporte del producto entre 0 y 4° C. El análisis debe iniciar en el menor tiempo posible desde la llegada al laboratorio, pero si no es posible realizarlo dentro de las seis horas, el mantenimiento entre 2 y 6°C permite la ampliación del plazo a las 24 horas desde la toma de muestra. La FAO permite el retraso de un análisis hasta un máximo de treinta y seis horas cuando las muestras han sido refrigeradas entre 0-4°C.

ANEXO N° 2. INFORMACION QUE DEBE ACOMPAÑAR A LAS MUESTRAS Y CONTROLES.

La toma de muestra

- Lugar, fecha y hora del muestreo.
- Número de muestras tomadas.
- Análisis programado.
- Observaciones adicionales.

**ANEXO Nº 3. PRECAUCIONES Y CUIDADOS A TOMAR PARA REALIZAR
ANÁLISIS DE FOSFATASA ALCALINA PARA EVITAR
RESULTADOS FALSOS POSITIVOS EN LOS ENSAYOS.**

-Realizar el análisis en una atmósfera libre de fenol, todo el material de vidrio, tapaderas y todo el material utilizado en el muestreo debe estar completamente limpio. El lavado debe hacerse cuidadosamente con agua tibia y se debe utilizar un detergente que no contenga compuestos fenólicos, luego se debe enjuagar con agua destilada, se recomienda usar desinfectantes del tipo de amonio cuaternario.

-Los reactivos deberán mantenerse en frascos herméticamente cerrados para evitar su deterioro o contaminación.

-Los cierres plásticos de los frascos de los reactivos pueden causar contaminación fenólica por lo que su uso debe ser evitado, por el contrario se recomienda el uso de tapones de vidrio o de goma de primera calidad, los cuales se ha comprobado están libres de compuestos fenólicos.

-Para cada muestra de queso debe emplearse espátulas y agitadores distintos y limpios.

-Usar un volumen de agua suficiente, en el baño de maría, para que el contenido de las muestras alcance una temperatura de 37°C a los 10 minutos de colocados y que el nivel del agua quede ligeramente por encima del nivel del contenido de los tubos.

-Precauciones generales a tomar en los métodos para determinar fosfatasa alcalina.

Debido a la extremada sensibilidad de la prueba de la fosfatasa empleando fenil fosfato disódico como sustrato para disminuir la cantidad de fenol y compuestos fenólicos, es esencial que todas las pipetas, frascos y tapones, etc., y todos los reactivos estén libres de fenol para evitar un resultado en la prueba falso positivo.

A. Cristalería:

Toda la cristalería deberá ser enjuagada con agua tibia, y lavada con un detergente que no contenga compuestos fenólicos, enjuagar con agua de grifo y luego con agua destilada u otra agua tratada adecuadamente con un grado reactivo, airear o dejar secar, y proteger de la contaminación durante el almacenaje. Este procedimiento es recomendable seguirlo inmediatamente después del uso.

Piezas representativas pueden ser probadas para determinar si la cristalería esta libre de fenol.

B. Tapaderas:

El uso de tapaderas plásticas deberá ser evitado desde que contaminación fenólica procedente de ellos ha sido encontrada. Los tapones de goma generalmente están libres de compuestos fenólicos, pero ellos no deben emplearse en frascos con alcohol butílico.

C. Reactivos:

Mantenga todos los frascos con reactivos muy bien cerrados para prevenir deterioro y contaminación de los mismos.

La presencia de fenol libre en los buffer sustrato que contienen fenil fosfato disódico, frecuentemente es una causa de color azul en las pruebas de control. Este color es causado por el deterioro del buffer sustrato o por el fenil fosfato disódico que no está libre de fenol. El deterioro del fenil fosfato disódico puede ser retrasado por calentamiento a 85°C por 2 minutos. Debe usarse, de ser posible Fenil fosfato disódico libre de fenol. Para la prueba de fenol en el Buffer sustrato, agregue 2 gotas de CQC a 10 mL de buffer sustrato e incube por 5 minutos a temperatura ambiente. Si se desarrolla algún color, el sustrato buffer debe ser descartado y preparase una nueva solución buffer.

Si el fenil fosfato disódico no está libre de fenol, una solución satisfactoria de buffer sustrato podrá prepararse empleando un frasco separador, disolver 1.1 g de di sodio fenil fosfato en 50mL de buffer, usando el método de Cornell; o 0.5 g de disodio fenilfosfato en 25 mL de buffer, usando el método de Scharer. Adicionar 2 gotas de CQC, agitar, y dejar que se desarrolle color por 10 minutos. Extraer el color azul indofenol por agitación vigorosa con 10 mL de *n*-butil alcohol. Dejar reposar hasta que la capa de alcohol se separe completamente. Remueva la capa de alcohol y diluya la solución acuosa hasta 1 litro con solución buffer, usando el método de Cornell; o diluya hasta 500mL con agua, usando el método de Scharer.

Si se usan las tabletas Phos- Phax en la prueba rápida de Scharer, disolver una tableta de Phos-Phax en 5 mL de agua. Agregar 2 gotas de CQC, mezclar bien, y deje por 5 minutos para que desarrolle color. Extraer el color con 2 mL de *n*-butil alcohol. Dejar reposar hasta que el alcohol se separe, remover el alcohol con una pipeta, y descartar. Diluir la solución acuosa hasta 50 mL con agua. Estas soluciones deben ser preparadas recientemente antes de usar, ya que se descomponen con el transcurso del tiempo. No deben almacenarse en refrigeración más de una semana.

El CQC en polvo debe guardarse en frascos herméticamente cerrados y en refrigeración. Cuando se prepara la solución de CQC, se debe dejar que el polvo tenga la temperatura ambiente antes de abrir el frasco para evitar la condensación de humedad en el reactivo. Refrigerar la solución de CQC y descartarla cuando se deteriore (se vuelva color café).

ANEXO Nº 4. CONTROLES APLICABLES A TODOS LOS PROCEDIMIENTOS PARA FOSFATASA ALCALINA.

Los controles son para determinar deterioro o contaminación de los reactivos; para determinar sustancias interferentes como lo son los materiales saborizantes que posean una estructura fenólica; para describir variaciones en el color del azul de indofenol que resulte de la interferencia de grasa y materiales colorantes, particularmente si se ha hecho una extracción directa con butanol, y para comprobar la posible presencia de fosfatasa microbiana.

A. Control Negativo:

Un control negativo debe ser usado con cada tipo de los productos lácteos que serán muestreados. Coloque aproximadamente 5 mL o 5 g de producto en cada tubo de ensayo conteniendo un termómetro y calentar a 90 °C por un minuto seguido de un enfriamiento rápido. Agite el contenido del tubo durante el calentamiento para asegurar la completa inactivación de la fosfatasa alcalina. Prueba el calentamiento de la muestra para fosfatasa. Cualquier desarrollo de color en el control negativo no es indicio de fosfatasa residual, pero indica la contaminación de reactivos o la presencia de interferencia de materiales colorantes o ambos. Idealmente, el control negativo no debe mostrar coloración alguna.

B. Control Positivo:

Como una prueba del funcionamiento correcto de los reactivos, un único control positivo será suficiente para cada serie de muestras a ensayar. Agregue 0.1 mL de leche cruda fresca proveniente de mezclar varios ordeños a 1000 mL de leche cruda que ha sido calentada a 90°C por un minuto, seguido por un rápido enfriamiento hasta temperatura ambiente. Cuando la prueba de fosfatasa se realice en la muestra, un resultado positivo debe obtenerse.

C. Control de Sustancias Interferentes:

Desde la vainillina, hasta otros compuestos con estructuras fenólicas pueden estar presente en leches con sabor a chocolate, cremas presurizadas, coberturas y helado, puede obtenerse un resultado falso positivo cuando el sustrato es el disodio fenil fosfato. Los productos lácteos esterilizados procesados con el método HTST pueden contener sustancias que reaccionen en la prueba de la fosfatasa y produzcan resultados falsos positivos. Cuando un resultado falso positivo se obtiene en las muestras, las pruebas deben ser repetidas usando la misma cantidad de muestra pero sustituyendo la solución buffer por la misma cantidad de buffer sustrato.

En la ausencia de disodio fenil fosfato o monofosfato de fenoltaleina cualquier color es causado por sustancias interferentes y por fosfatasa residual. Sin embargo, si el color de los pruebas usando el buffer sustrato es mayor que el color obtenido en el control de s sustancias interferentes, indica que el producto ha sufrido una baja pasteurización y/o una contaminación con leche cruda.

D. Fosfatasa microbiana:

La posibilidad de la producción de fosfatasa por microorganismos en los productos lácteos, particularmente en crema. Las fosfatasas microbianas son considerablemente más termoresistentes que la fosfatasa alcalina de la leche, por lo que la su diferenciación es posible con la siguiente técnica:

Si la prueba de la fosfatasa original es positiva, pasteurizar una porción de 5 mL de porción de la muestra y calentar a 62.8°C por 30 minutos en un tubo de ensayo. Sumergir completamente el tubo o sumergir hasta que hasta que la línea de agua cubra 4.0 cm. arriba del nivel de la leche en el tubo. La temperatura de la leche debe alcanzar al menos 62.3°C en menos de 5 minutos. Mantener el termómetro inmerso en la muestra o colocado adecuadamente para su control. Enfriar y realizar la prueba de fosfatasa en la muestra repasteurizada, la muestra original y el control negativo. Si la muestra repasteurizada no muestra una reducción significativa en el color, el resultado original fue debido a fosfatasa microbiana. Deberá ser clasificada como falso positivo y reportada como negativo.

ANEXO Nº 5
ESQUEMA DEL METODO RAPIDO DE SCHARER

METODO RÁPIDO DE SCHARER PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (12), (13)



Muestra

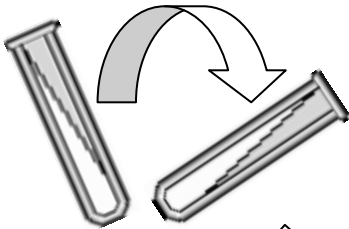
Agregar 0.5 mL de muestra
(Ver procedimiento para diferentes tipos de muestras lácteas)



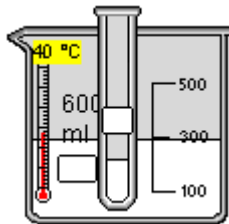
Luego agregar:
+ 5 mL de Sustrato Buffer.
(Ver procedimiento para diferentes tipos de muestras lácteas)



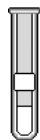
Tapar el tubo y agitar por inversión repetidas veces



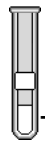
Incubar el tubo a 40°C durante 15 minutos



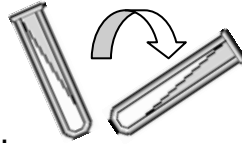
Remover el tubo del Baño de agua



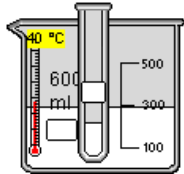
Adicionar 6 gotas de reactivo CQC (con catalizador)
De no contener catalizador entonces también agregar 2 gotas de $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$.



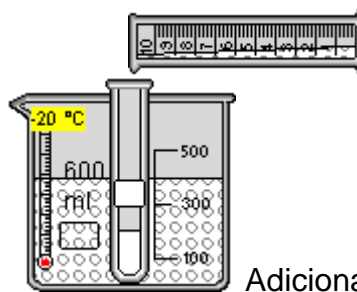
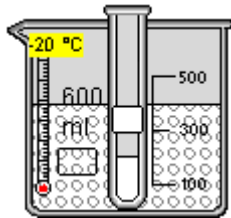
Tapar y agitar por inversión.



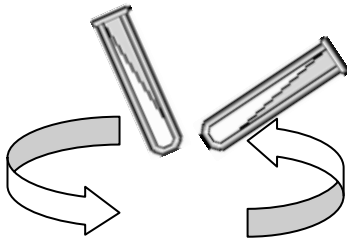
Luego reincubar a 40°C por 5 minutos



Remover del Baño de agua y Enfriar en Baño de agua helada.



Adicionar en frío 3 mL de n-butanol neutralizado y enfriado.
Tapar el tubo.



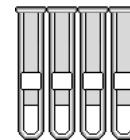
Invertir suave y lentamente los tubos 4 veces haciendo medios círculos.



Extraer el color: Dejar reposar el tubo tapado en posición horizontal sobre una superficie plana por 2 minutos.



Repetir la agitación y la extracción



Luego comparar el color de la capa alcohólica con la de los estándares preparados. Utilizando una luz estándar. (Color azul indica Fosfatasa alcalina +)

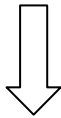
ANEXO N° 6
ESQUEMA DEL METODO DE SCHARER MODIFICADO

METODO DE SCHARER MODIFICADO PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (12)

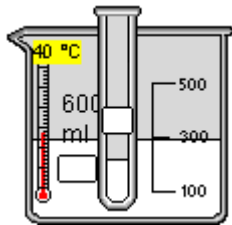


Tubo Muestra

Adicionar 0.5 mL de Muestra
+5 mL de Buffer Sustrato



Tapar el tubo e incubar por 1 hora y
5 minutos a 40 °C.



Remover el tubo del Baño de agua



Adicionar 6 gotas de reactivo
CQC (con catalizador) de no
contenerlo adicionar 2 gotas de
 $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$

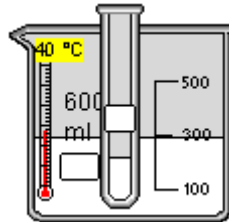


Tubo Control

Adicionar 0.5 mL de Muestra
calentada a 90°C y enfiada.
+5 mL de Buffer Sustrato



Tapar el tubo e incubar por 1 hora y
5 minutos a 40 °C.

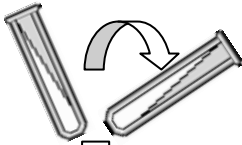


Remover el tubo del Baño de agua

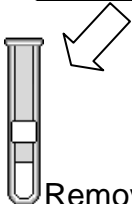
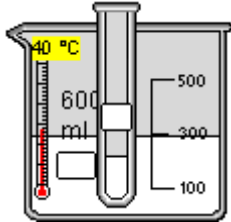


Adicionar 6 gotas de reactivo
CQC (con catalizador) de no
contenerlo adicionar 2 gotas de
 $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$

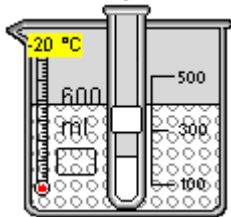
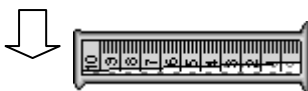
Tapar el tubo y agitar por inversión



Reincubar a 40 °C por 5 minutos

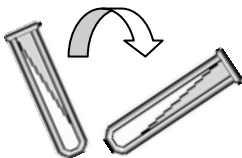


Remover el tubo del Baño y enfriar en Baño de agua helada.

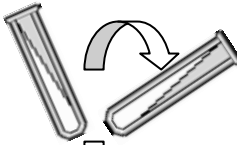


Y agregar en frío 5 mL de alcohol n- butílico enfriado.

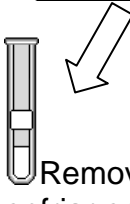
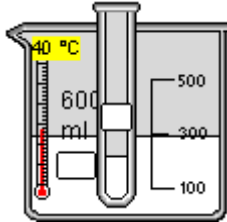
Tapar el tubo y Agitar por inversión nuevamente



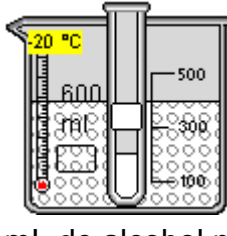
Tapar el tubo y agitar por inversión



Reincubar a 40 °C por 5 minutos

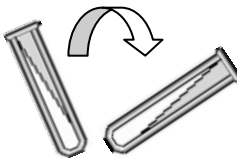


Remover el tubo del Baño y enfriar en Baño de agua helada.



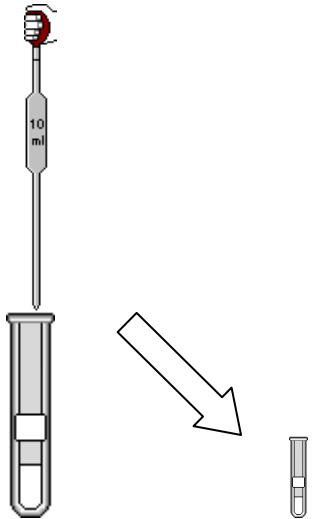
Y agregar en frío 5 mL de alcohol n- butílico enfriado.

Tapar el tubo y Agitar por inversión nuevamente





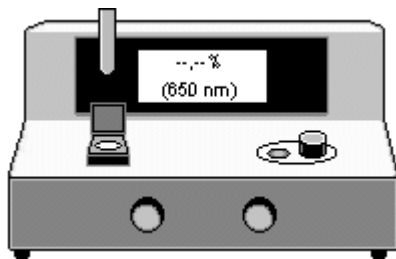
Centrifugar por 5 minutos.
Luego



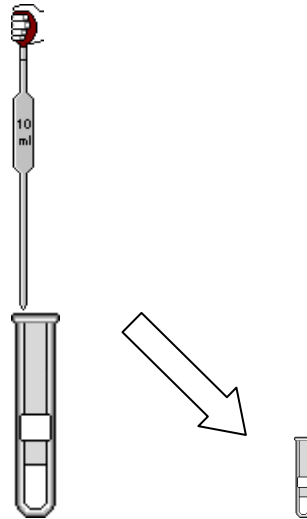
Pipetear 3 mL de la capa alcohólica
y transferir a una celda
espectrofotométrica.



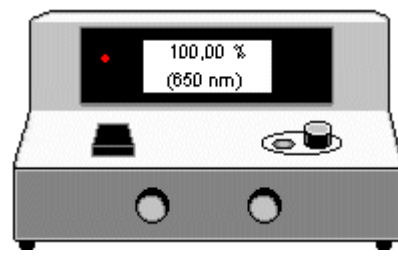
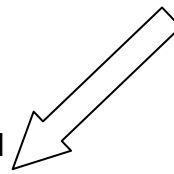
Leer la Absorbancia a 650 nm.
Llevar a 0 Transmancia con el control
negativo



Centrifugar por 5 minutos
Luego

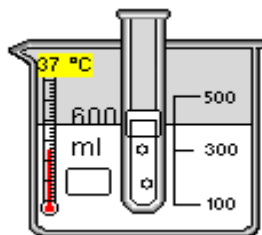
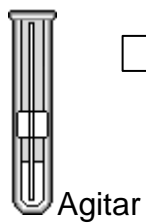
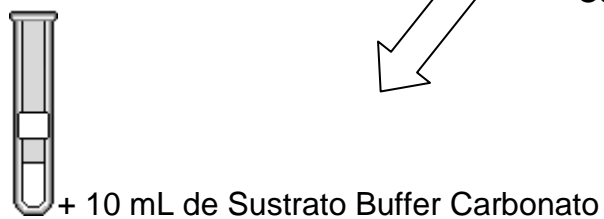
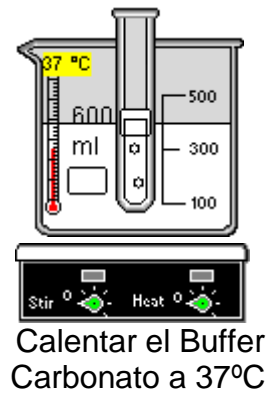
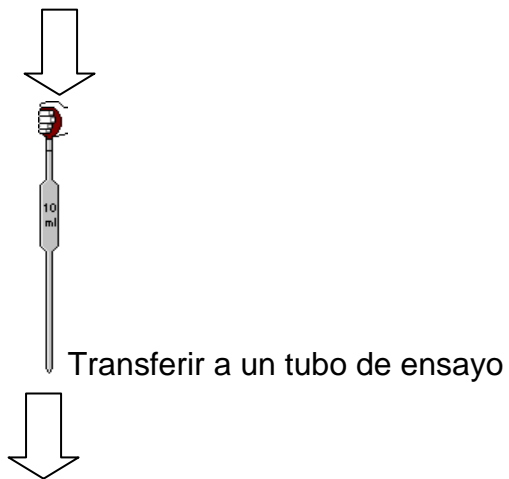
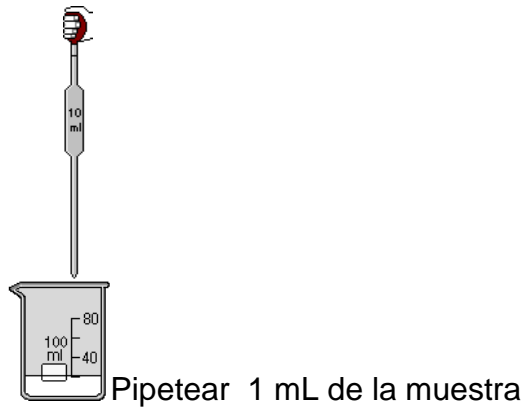


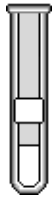
Pipetear 3 mL de la capa alcohólica
y transferir a una celda
espectrofotométrica.



ANEXO N° 7
ESQUEMA DEL METODO DE CORNELL

METODO DE CORNELL PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (12),





Remover el tubo del Baño de agua.



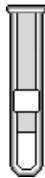
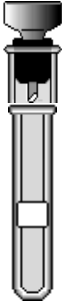
Agregar por las paredes del tubo inclinado 1 mL de Precipitante tricloroacetico/HCl



Luego



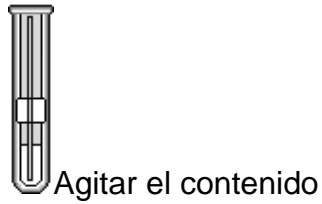
Filtrar hacia un tubo limpio y calibrado a intervalos de 5 mL



A 5 mL del filtrado claro obtenido



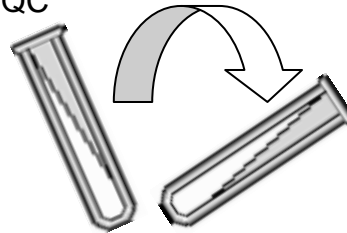
Adicionar 1 ml de Solución $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$ /
Hexametáfosfato de sodio.
+ 5 mL de Solución de carbonato de sodio 8%



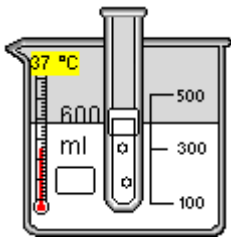
Agregar 2 gotas de solución CQC



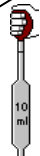
Tapar el tubo
Inmediatamente



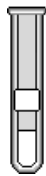
Invertir el tubo varias veces



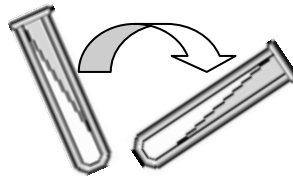
Incubar a 37°C durante 5 minutos exactos
para desarrollo del color.



Adicionar 5 mL de alcohol n-butílico

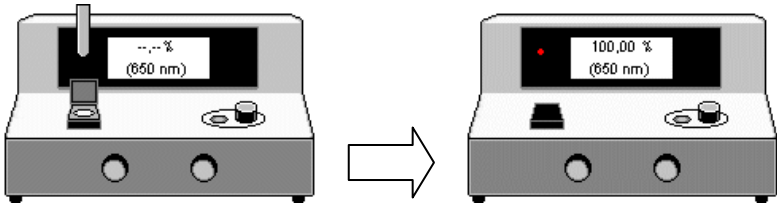
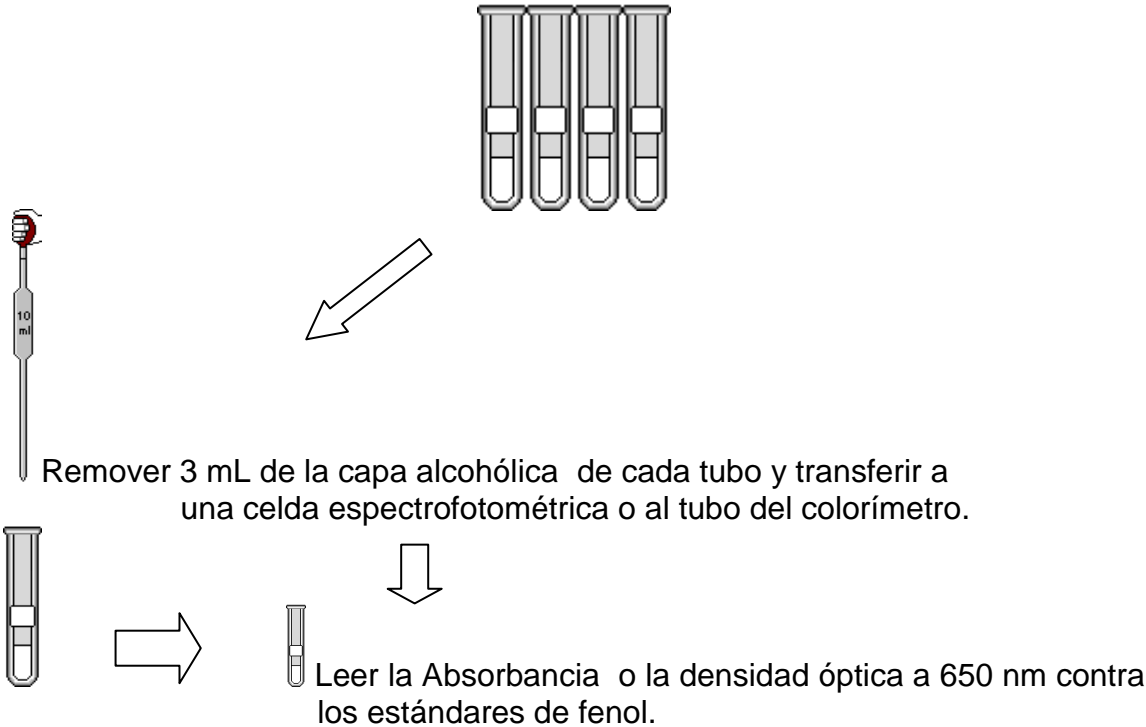


Tapar el tubo



Inmediatamente
invertir el tubo varias veces

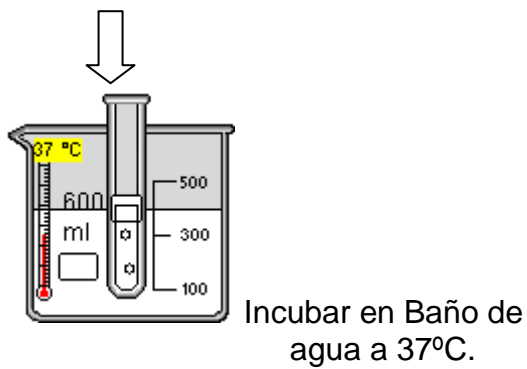
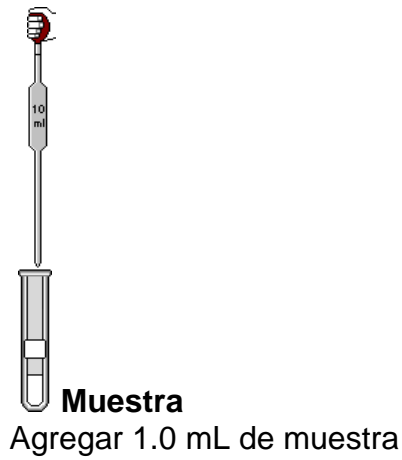
Comparar el color que se produce en la capa alcohólica con los estándares de fenol preparados.



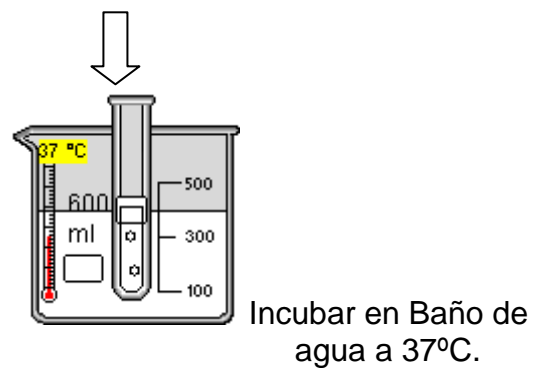
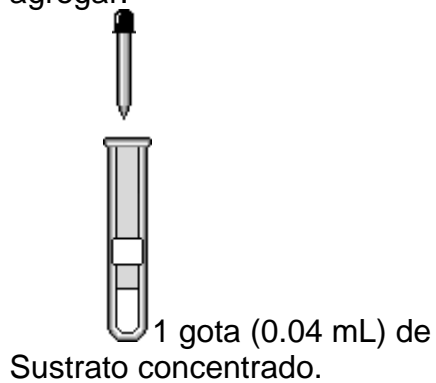
(Color azul indica Fosfatasa alcalina +)

ANEXO N° 8
ESQUEMA DEL METODO DE RUTGERS

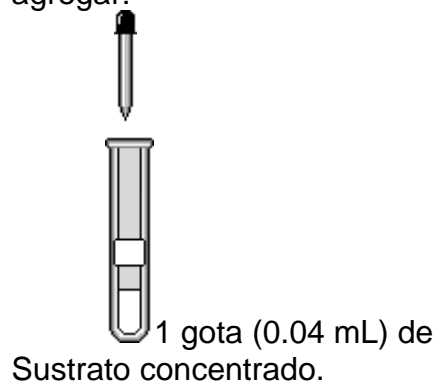
METODO DE RUTGERS PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (12)

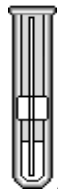


Quando el contenido del tubo alcance la temperatura de 37 °C, agregar:



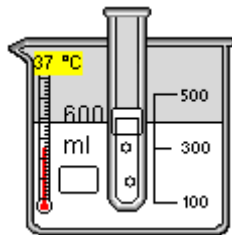
Quando el contenido del tubo alcance la temperatura de 37 °C, agregar:





Agitar

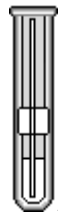
Incubar en Baño de agua a 37°C durante 30 minutos



Agregar 1 gota de solución reveladora del color.

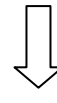
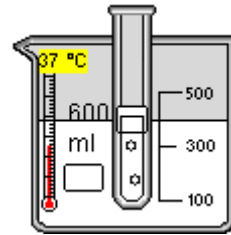


Comparar visualmente la muestra con el estándar (color rosado intenso indica Fosfatasa alcalina + y rosado tenue indica una pasteurización adecuada)



Agitar

Incubar en Baño de agua a 37°C durante 30 minutos



Agregar 1 gota de solución reveladora del color.



Comparar el estándar visualmente con la muestra.

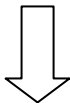
ANEXO N° 9
ESQUEMA DEL METODO DE ASCHAFFENBURG Y MULLEN

METODO DE ASCHAFFENBURG Y MULLEN PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (24), (27)

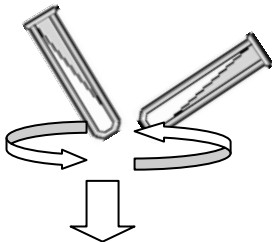


Muestra

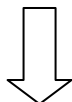
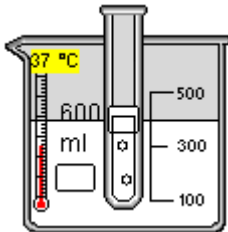
Adicionar al tubo 15 mL de Sustrato tamponado + 2 mL de Muestra.
Tapar el tubo.



Agitar por inversión haciendo medios círculos



Incubar a 37°C durante 2 horas.

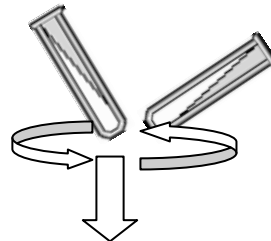


Control Negativo

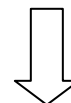
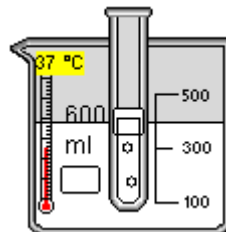
Adicionar al tubo 15 mL de Sustrato tamponado + 2 mL de Muestra previamente llevada a ebullición.
Tapar el tubo.



Agitar por inversión haciendo medios círculos



Incubar a 37°C durante 2 horas.



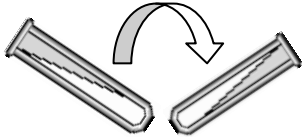
Sacar el tubo del baño de agua.



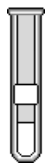
Agregar 0.5 mL de
Precipitante Sulfato de Zinc.
Tapar el tubo



Agitar vigorosamente el tubo



Luego dejar reposar por 3 minutos



Agregar 0.5 mL de
precipitante Hexaferrocianuro

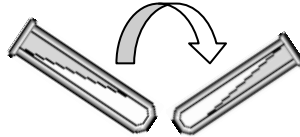
Sacar el tubo del baño de agua.



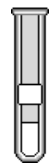
Agregar 0.5 mL de
Precipitante Sulfato de Zinc.
Tapar el tubo



Agitar vigorosamente el tubo

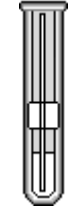


Luego dejar reposar por 3 minutos

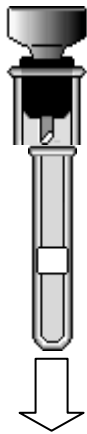


Agregar 0.5 mL de
precipitante Hexaferrocianuro

Agitar



Filtrar en papel plegado y recoger el filtrado en un tubo limpio.



Transferir el filtrado obtenido al tubo del colorímetro para medir su densidad óptica. (El color del filtrado, amarillo indica actividad Fosfatasa alcalina y deberá ser menos intenso que el observado en las placas patrones de p-nitrofenol del colorímetro)

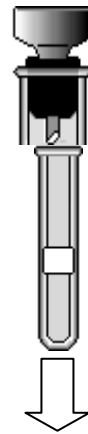


Muestra

Agitar



Filtrar en papel plegado y recoger el filtrado en un tubo limpio.



Transferir el filtrado obtenido al tubo del colorímetro para medir su densidad óptica.



Control Negativo




Blanco

Llenar otra célula con agua destilada el cual será el blanco.

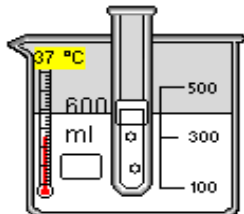
ANEXO Nº 10
ESQUEMA DEL METODO DE SANDERS Y SAGER MODIFICADO

METODO DE SANDERS Y SAGER PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (24), (27)

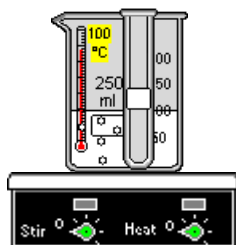

Muestra
Colocar 1 mL de la muestra
+ 10 mL de Sustrato tamponado.


↓
Agitar


↓
Incubar a 37°C durante 1 hora
agitando de vez en cuando.



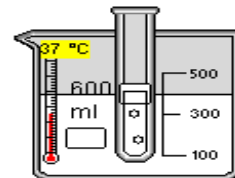
↓
Retirar del Baño de agua y de inmediato introducir en Baño de agua a 100°C y calentar por 2 minutos



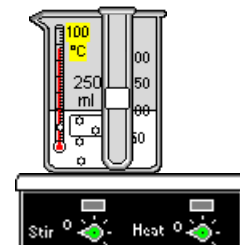

Control Negativo
Colocar 1 mL de la muestra
previamente calentada a 100°C
durante 2 minutos y enfiada.
+ 10 mL de Sustrato tamponado.

↓
Agitar

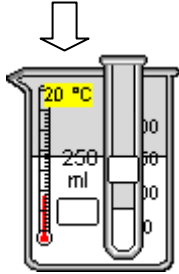

↓
Incubar a 37°C durante 1 hora
agitando de vez en cuando.



↓
Retirar del Baño de agua y de inmediato introducir en Baño de agua a 100°C y calentar por 2 minutos.



Luego enfriar en Baño de agua a temperatura ambiente.



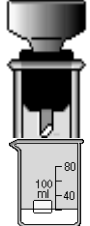
Luego agregar 1 mL de solución precipitante



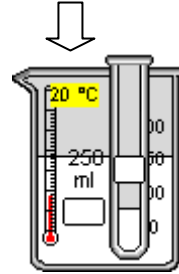
Agitar



Filtrar



Luego enfriar en Baño de agua a temperatura ambiente.



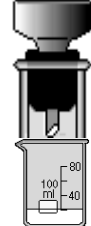
Luego agregar 1 mL de solución precipitante



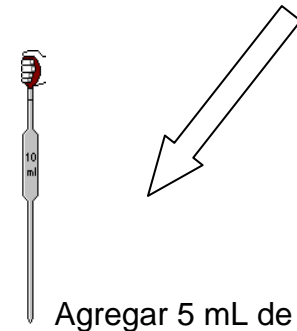
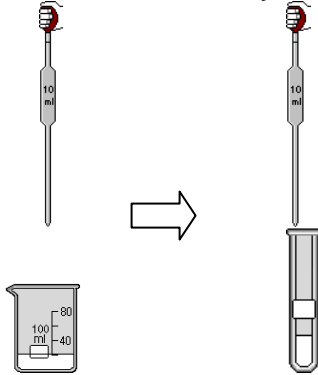
Agitar



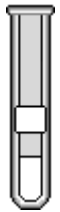
Filtrar



Tomar 5 mL del filtrado y transferirlo a un tubo de ensayo

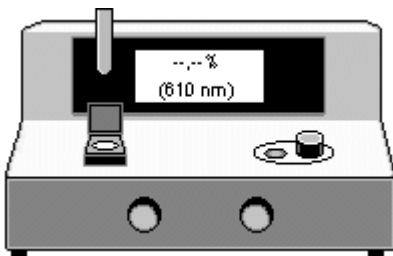


Agregar 5 mL de solución tampón para desarrollar el color

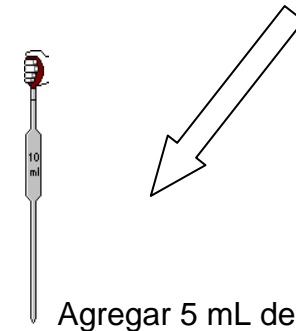
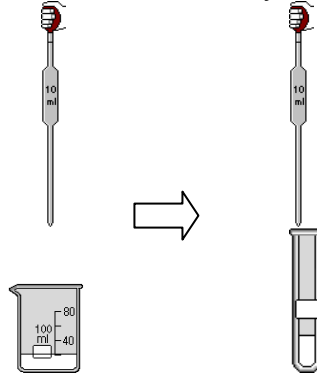


Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente PROTEGER DE LA LUZ SOLAR. (Coloración amarilla)

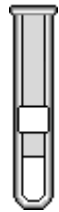
Medir la Absorbancia de la muestra a 610 nm.



Tomar 5 mL del filtrado y transferirlo a un tubo de ensayo

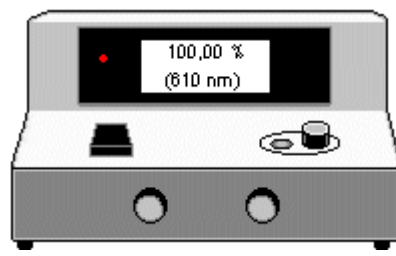


Agregar 5 mL de solución tampón desarrollador de color



Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente PROTEGER DE LA LUZ SOLAR. (No hay color)

Medir la Absorbancia del Blanco y los estándares de fenol a 610 nm.

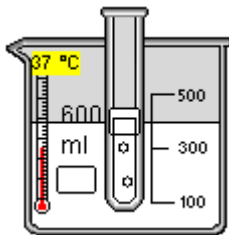


ANEXO Nº 11
ESQUEMA DE LA PRUEBA CON 4- AMINOANTIPIRINA

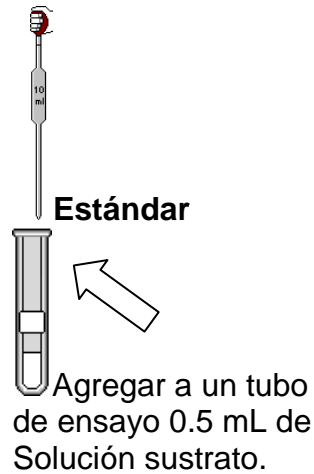
REACCION CON 4-AMINOANTIPIRINA PARA FOSFATASA ALCALINA RESIDUAL. (55)



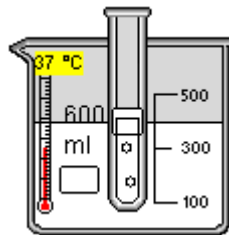
Incubar en Baño de Agua a 37°C por 4 min.



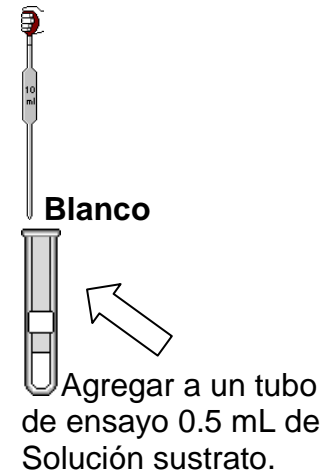
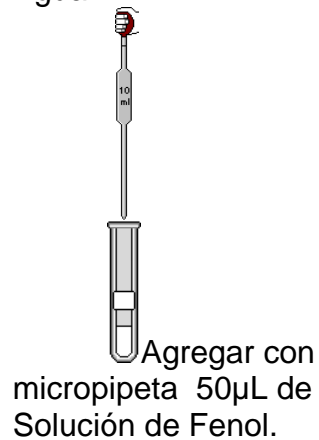
Retirar del Baño de Agua.



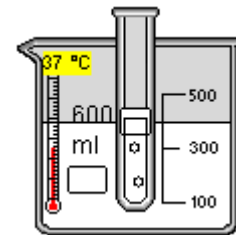
Incubar en Baño de Agua a 37°C por 4 min.



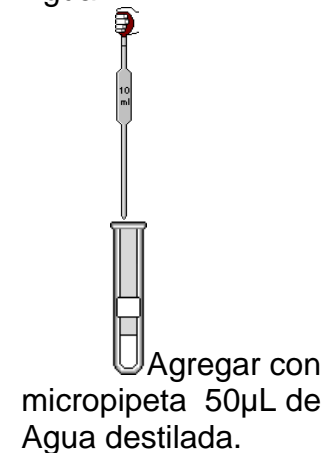
Retirar del Baño de Agua.





Incubar en Baño de Agua a 37°C por 4 min.




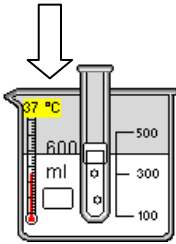
Retirar del Baño de Agua.

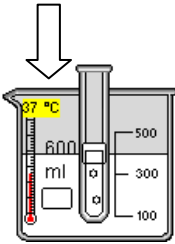


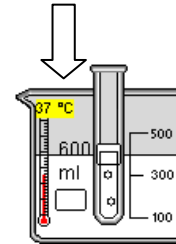
→  Agitar de preferencia con agitador de vórtice.

→  Agitar de preferencia con agitador de vórtice.

→  Agitar de preferencia con agitador de vórtice.

↓  Reincubar exactamente por 10 minutos a 37 °C


↓  Reincubar exactamente por 10 minutos a 37 °C


↓  Reincubar exactamente por 10 minutos a 37 °C


↓ Sacar el tubo con muestra de la incubadora

↓ Sacar el tubo con muestra de la incubadora

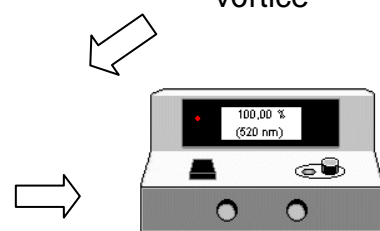
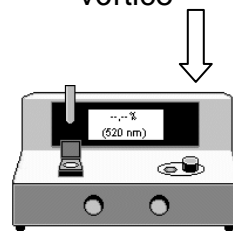
↓ Sacar el tubo con muestra de la incubadora

 Agregar 2.5 mL de solución de Ferrocianuro de potasio y Agitar de ser posible con vórtice.

 Agregar 2.5 mL de solución de Ferrocianuro de potasio y Agitar de ser posible con vórtice

 Agregar 2.5 mL de solución de Ferrocianuro de potasio y Agitar de ser posible con vórtice

↓ Leer la Absorbancia de cada tubo a (520 nm), en los siguientes 30 min. Ajustar a cero el espectrofotómetro con agua destilada.



ANEXO Nº 12
ESQUEMA DE METODO PARA DETERMINAR FOSFATASA
ALCALINA REACTIVADA

METODO DIFERENCIADOR ENTRE FOSFATASA RESIDUAL Y REACTIVADA. (12), (28), (29)



Control Negativo

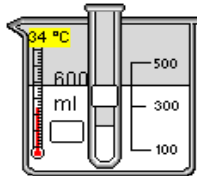
Muestra sin adicionar Acetato de Mg.



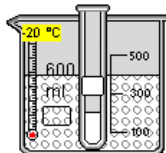
Agregar 5 mL de muestra +0.1 mL de agua destilada.



Incubar por 1 hora a 34 °C, agitando el tubo ocasionalmente.



Remover el tubo control negativo del baño de agua y Enfriar en baño de agua helada



Al estar frío sacar del baño y realizar cualquiera de las pruebas para fosfatasa ya sea por el método de Rutgers, Cornell o cualquier otro método espectrofotométrico. (Actividad fosfatasa mayor que la muestra diluida indica fosfatasa alcalina residual en la muestra)



Control Positivo

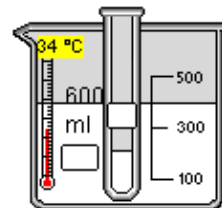
Muestra adicionada con Acetato de Mg.



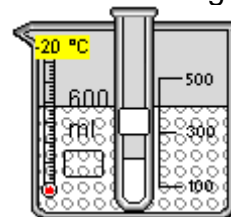
Agregar 0.1 mL de solución acetato de Magnesio. Mg (C₂H₃O₂)₂



Incubar por 1 hora a 34 °C, agitando el tubo ocasionalmente.



Remover el tubo del baño de agua y Enfriar en baño de agua helada



Luego de enfriar el tubo proceder de la siguiente manera:



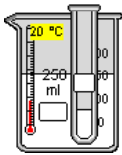
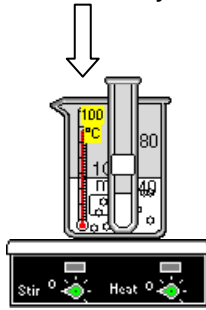
Control Positivo

Muestra adicionada con Acetato de Mg.



Tubo Control Positivo

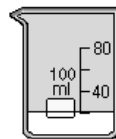
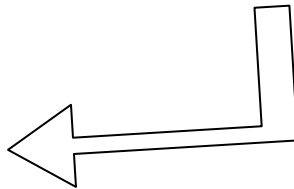
Agregar 5 mL de muestra y llevar a ebullición.



Sacar el tubo y enfriar



Tomar 1 mL de Acetato Magnésico y transferirlo al tubo control.



Solución de Acetato Mg.

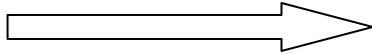


Tubo control positivo. A este realizar cualquiera de las pruebas para fosfatasa ya sea por el método de Rutgers, Cornell o cualquier otro método espectrofotométrico. (Actividad fosfatasa igual o aumentada a la muestra sin diluir indica fosfatasa alcalina reactivada en la muestra)

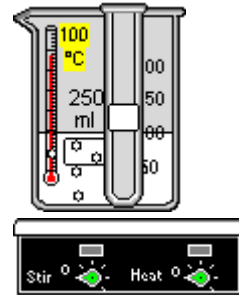
ANEXO Nº 13
ESQUEMA DE REACCION DE DUPOY

REACCION DE DUPOY PARA LACTOPEROXIDASA

Control negativo



Agregar a un tubo 2 mL de leche



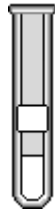
Calentar en baño de agua caliente a 100°C por 10 min. (Leche hervida)

Blanco



Agregar 3 mL de Tampón Fosfato
+ 1 mL de H₂O₂
+ 1 mL de solución de Guayacol 0.04M

Muestra

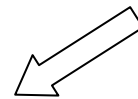
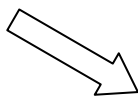


Agregar 3 mL de Tampón Fosfato
+ 1 mL de H₂O₂
+ 1 mL de solución de Guayacol 0.04M

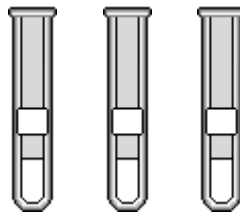
Control negativo



Agregar 3 mL de Tampón Fosfato
+ 1 mL de H₂O₂
+ 1 mL de solución de Guayacol 0.04M



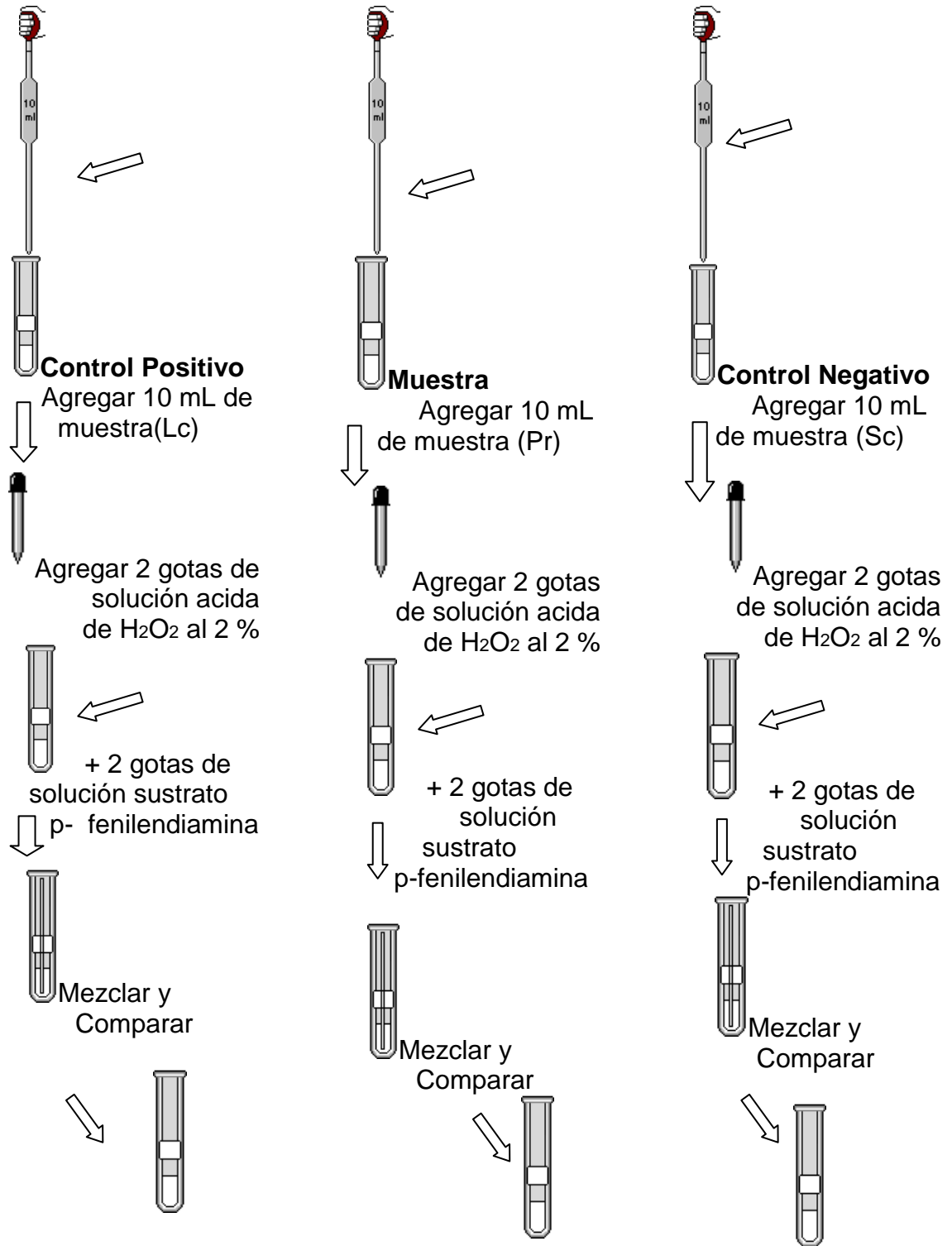
Compararla coloración de los tres tubos visualmente,



(Color anaranjado indica presencia de Lactoperoxidasa +)

ANEXO Nº 14
ESQUEMA DE METODO DE STORCH

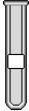
PRUEBA DE STORCH PARA LACTOPEROXIDASA


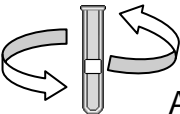



(Color azul intenso indica presencia de Lactoperoxidasa +)

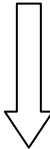
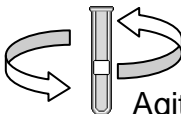
ANEXO Nº 15
ESQUEMA DE METODO DE ROTHENFUSSER

METODO DE ROTHENFUSSER PARA LACTOPEROXIDASA. (48)

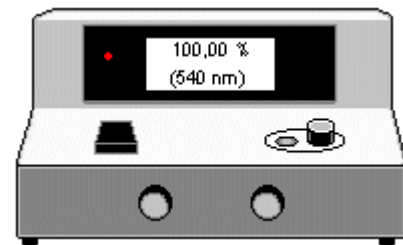
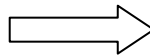
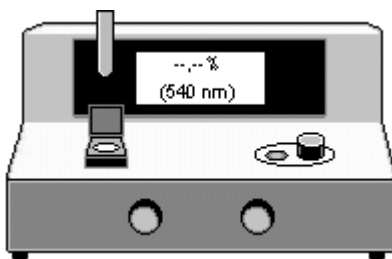
 Agregar 3 mL de Tampón fosfato
+30 μ L de suero o leche
+250 μ L de reactivo de Rothenfusser
+50 μ L de H₂O₂ al 1%



Agitar por inversión y
esperar 2 min.

 Agregar 3 mL de Tampón fosfato
+250 μ L de reactivo de Rothenfusser
+50 μ L de H₂O₂ al 1%

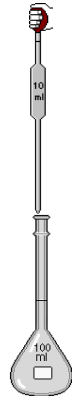


Agitar por inversión y
esperar 2 min.

Leer la muestra y el blanco en Espectrofotómetro a 540 nm

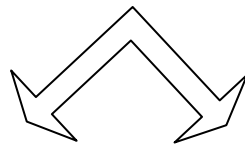


ANEXO Nº 16
ESQUEMA DE METODO DE ABTS

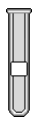
METODO ABTS PARA LACTOPEROXIDASA. (48)



Agregar 25 μ L de Suero de leche acido
+ 5 mL de Solución Sustrato ABTS
Homogenizar.

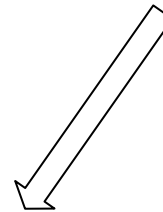


Transferir 2.5 mL a una
celda espectrofotométrica
(Blanco)

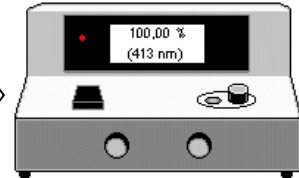
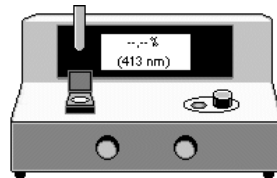


Agregar 50 μ L
de Solución H_2O_2 0.005 M

Transferir 2.5 mL a una
celda espectrofotométrica



Leer ambas a 413 nm cada minuto durante 5 minutos

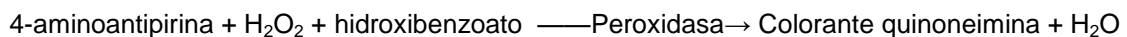
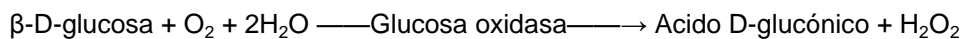


ANEXO N° 17
METODO POR REACCION DE TRINDER.

ANEXO Nº. 17. METODO POR REACCION DE TRINDER.

Aunque el método de Trinder, esta basado en la determinación de Azucares específicos como la glucosa y la Sacarosa, dentro de su reacción fundamental de manera indirecta se emplea la enzima Lactoperoxidasa para poder cuantificar peroxido de hidrogeno de azucares en la muestra. Esta prueba es empleada tanto en la industria de alimentos como en el área clínica, pues también es empleada para determinar glucosa en fluidos corporales como: suero libre de hemólisis, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, e hidrolizado de muestras de hígado para valorar glucógeno.

Está basado en el esquema indicado a continuación. La glucosa oxidasa oxida a la glucosa originando ácido glucónico y H₂O₂. El peróxido de hidrógeno liberado reacciona con un cromógeno (fenol/4-aminoantipirina) por la reacción de Trinder, para dar una quinona que absorbe entre 492 y 550 nm. La intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa. Como se muestra en las reacciones siguientes que se llevan a cabo en el método.



Aunque el método esta dado para Glucosa y Sacarosa este podría ser ensayado y normalizado en estudios futuros específicamente para leche y queso.

DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA Y SACAROSA EN ALIMENTOS. (Reacción de Trinder)

Cuantificación de glucosa y sacarosa en una muestra de zumo comercial. La cantidad de colorante generada en la reacción con la peroxidasa, y por tanto la absorbancia medida a 505 nm, será directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente.

A. Cristalería:

- Frascos volumétricos de 100 mL
- Frasco volumétrico de 25 mL
- Beakers de 250 mL, 100 mL

B. Equipo:

Espectrofotómetro monohaz Spectronic 20 con celdas de 1 cm de paso de luz.

C. Materiales:

- Embudo
- papel filtro
- Vidrio de reloj

D. Reactivos:

-Reactivo Trinder: Disolución que contiene todos los reactivos necesarios para la determinación de glucosa en las concentraciones que se indican a continuación: 4-aminoantipirina 0,3 mmol/L y p-hidroxibencensulfonato 8.5

mmol/L, Glucosa oxidasa (GOD) obtenida de *Aspergillus Niger* 10 U/mL, Peroxidasa de rábano silvestre (Horseradish peroxidase, HRP) 0,3 U/mL

Estos reactivos, en las cantidades adecuadas, se suministran en una disolución reguladora de pH 6,6 lista para su uso. Esta disolución debe almacenarse en frasco color ámbar y en el refrigerador. Si se mantiene entre 2 –8 °C la disolución estable durante 2 meses.

Disolución de invertasa 100 U/ml en tampón de citrato 0,1 M de pH 4,6. Preparar 50 mL.

Disolución patrón de glucosa 0,01 M

Disolución Carrez I: Disolver en agua 3,6 g de ferrocianuro potásico y llevar a 100 mL.

Disolución Carrez II: Disolver en agua 7,2 g de acetato de zinc y llevar a 100 mL

D. Procedimiento.

Preparar las soluciones de los reactivos indicados y disolver en una disolución reguladora de Tris 0,02 M de pH 6.6. Llevar a volumen en un frasco volumétrico de 100 mL. Esta disolución debe almacenarse en frascos color ámbar y en el refrigerador.

Para la construcción de la línea de calibrado deben prepararse cinco disoluciones de glucosa de concentraciones comprendidas entre $5 \cdot 10^{-5}$ M y $5 \cdot 10^{-4}$ M por dilución del patrón de glucosa. Añadir a la celda del

espectrofotómetro 1 mL de reactivo Trinder y 250 μ L de patrón, mezclar e incubar exactamente 5 minutos a temperatura ambiente. Medir a continuación la absorbancia de la mezcla de reacción a 505 nm frente a un blanco de reactivos. Para la determinación de glucosa y sacarosa en la muestra, esta se diluirá con agua en la proporción adecuada según el contenido de glucosa y sacarosa esperado. Las muestras turbias deben tratarse con los reactivos Carrez y filtrarse. Para ello pipetear 2 mL de muestra en un vaso que contenga unos 30 mL de agua, añadir 2,5 mL de disolución Carrez I y 2,5 mL de disolución Carrez II. Filtrar, recoger cuantitativamente en un frasco volumétrico de 100 mL y llevar a volumen.

Para la determinación del contenido de glucosa, se procederá con la disolución diluida de la misma manera que con los patrones de glucosa.

Para determinar el contenido de sacarosa se llevará a cabo en primer lugar su hidrólisis enzimática a glucosa y fructosa (inversión) con invertasa. Para ello se toman 2 mL de la disolución de muestra (con un contenido máximo de sacarosa de 1 g/L) y se mezclan con 8 mL de la disolución de invertasa. Se incuban 15 minutos a 55 °C. La suspensión fría se filtra, se lava el filtro y se recoge cuantitativamente en un frasco volumétrico y luego enrasando con agua hasta la marca, realizando a continuación la determinación del contenido total de glucosa según el procedimiento anteriormente descrito. El contenido de sacarosa se obtiene por diferencia entre las concentraciones de glucosa

obtenidas antes y después de la inversión enzimática. Expresar el contenido de glucosa y sacarosa en la muestra en g/L.

-DETERMINACION DE GLUCOSA (METODO GLUCOSA - OXIDASA) EN FLUIDOS BIOLÓGICOS. (Reacción de Trinder)

1. Pipetear en tubos marcados como: blanco, estándar y muestras, los reactivos indicados en el cuadro. Incluir tantos tubos de muestras como se considere conveniente. Añadir en último lugar el reactivo de Trinder para comenzar la reacción.

Reactivos	Blanco	Estándar	Problema
Estándar (glucosa, 100 mg/dL)	-----	20 µL	-----
Muestra	-----	-----	20 µL
Reactivo de Trinder	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL

Reactivo De Trinder	
Glucosa oxidasa	12.000 UI/L
Peroxidasa (POD)	660 UI/L
4-amino-antipirina (4AP)	0,4 mmol/L
Fenol	0,63 mmol/L
Tampón fosfato pH 7,4	100 mmol/L

2. Incubar, 15 min. a 37 °C ó 30 min. a temperatura ambiente.

3. Ajustar el espectrofotómetro a cero de absorbancia a la longitud de onda de 500 nm y utilizando el tubo blanco, y leer los tubos restantes.

Con los valores de absorbancia del estándar y de los tubos problema se puede calcular la concentración de glucosa en la muestra.

$$\text{Concentración problema} = \frac{\text{Absorbancia del problema} \times \text{concentración estándar}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

Valores normales:

Suero o plasma: 70 - 110 mg/ dL

L.C.R.: 50 - 70 mg/ dL

Orina: No contiene, en condiciones fisiológicas normales.

ANEXO Nº 18

**TOXICIDAD DE SUSTANCIAS QUIMICAS PELIGROSAS EMPLEADAS
EN LOS ANALISIS Y HOJAS DE DATOS DE SEGURIDAD. (53)**

ALCOHOL N-BUTILICO

Número CAS: 71-36-3

Razones para citarlo:

- **El Alcohol n- Butílico** esta enlistada entre las sustancias peligrosas por ser citada por las siguientes instituciones: OSHA, ACGIH, DOT, NIOSH, DEP, IRIS, NFPA y EPA.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición al **Alcohol n- Butílico**.

- Al contacto puede irritar y quemar la piel.

- **Alcohol n- Butílico** puede irritar y quemar los ojos, con lagrimeo y posible daño ocular.

- Inhalar los vapores de **Alcohol n- Butílico** puede causar irritación de la nariz, garganta y pulmones causando tos, estornudos y disminución de la respiración.

- Exposición al **Alcohol n- Butílico** puede causar dolor de cabeza, mareos, náuseas y vómito. Altos niveles pueden causar mareos, desmayos, y puede producir palpitaciones irregulares.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **Alcohol n- Butílico** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

- De acuerdo a la información actualmente disponible en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey, **Alcohol n- Butílico** ha sido estudiado y no se han demostrado que tenga capacidad de producir cáncer.

Peligros a la Reproducción

Existe limitada evidencia de que el **Alcohol n- Butílico** es teratógeno en animales. Hasta que futuras pruebas se realicen debe ser considerado como un posible teratógeno en humanos.

Otros Efectos a largo plazo

Exposiciones prolongadas o repetidas pueden causar resequedad y agrietamientos en la piel con enrojecimiento.

Alcohol n- Butílico puede causar daño en el hígado y en los riñones.

La exposición al **Alcohol n- Butílico** puede dañar el oído y el sentido de balance.

DIETANOLAMINA

Número CAS:111-42-2

Resumen de Peligros:

Dietanolamina puede afectar la respiración.

- Al contacto puede irritar y quemar la piel y los ojos.
- Respirar **Dietanolamina** puede irritar la nariz y la garganta causando tos y estornudo.
- Respirar **Dietanolamina** puede causar dolor de cabeza, náusea y vómito.
- **Dietanolamina** puede causar alergia en la piel. Si la alergia se desarrolla, exposiciones futuras muy leves pueden causar picazón y sarpullido.

Razones para citarla:

Dietanolamina está enlistada entre las sustancias peligrosas por ser citada por las siguientes instituciones: ACGIH, NIOSH, DEP, NFPA y EPA.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición a la **Dietanolamina**:

- Al contacto puede irritar y quemar la piel y los ojos.
- Respirar **Dietanolamina** puede irritar la nariz y la garganta causando tos y estornudo.
- Respirar **Dietanolamina** puede causar dolor de cabeza, náusea y vómito.

- **Dietanolamina** puede causar alergia en la piel. Si la alergia se desarrolla, exposiciones futuras muy leves pueden causar picazón y sarpullido.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición a la **Dietanolamina** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

-Existe limitada evidencia de que la Dietanolamina cause cáncer en animales. Puede causar cáncer de hígado en animales.

Peligros a la Reproducción

- Lo que se ha estudiado al respecto con la **Dietanolamina**, se requiere un mayor número de pruebas para valorar que es potencialmente causa de daños reproductivos.

Otros Efectos a largo plazo.

- **Dietanolamina** puede causar alergia en la piel. Si la alergia se desarrolla, exposiciones futuras muy leves pueden causar picazón y sarpullido.

FENOL

Numero CAS: 108-95-2

Resumen de Peligros:

- **Fenol** puede afectar la respiración y por su paso a través de la piel.
- Por ser un MUTAGENO –MANEJAR CON EXTREMO CUIDADO.
- Al contacto puede irritar severamente y causar quemaduras de la piel y ojos con posible daño ocular.
- Respirar los vapores de **Fenol** puede causar irritación de nariz y garganta.
- Respirar los vapores de **Fenol** puede irritar los pulmones y causar tos y disminuir la respiración. Las altas exposiciones pueden causar acumulación de líquido en los pulmones (edema pulmonar), una emergencia médica, con severa disminución en la respiración.
- Altos niveles pueden interferir con la capacidad de la sangre para acarrear oxígeno causando dolor de cabeza, fatiga, mareos, y color azul en la piel y labios (metahemoglobinemia)
- Altos niveles pueden causar problemas respiratorios, colapso y hasta la muerte.
- Altas exposiciones pueden causar dolor de cabeza, mareos, fatiga, desmayos, debilidad, náusea, vómitos y falta de apetito.
- Exposiciones elevadas o repetidas pueden causar daño al hígado, riñones y sistema nervioso.

- **Fenol** puede causar palpitaciones irregulares (arritmia).

Razones para citarla:

- **Fenol** esta enlistado entre las sustancias peligrosas por estar regulado por OSHA y ser citado por las siguientes instituciones: ACGIH, DOT, NIOSH,

DEP, HHAG, NFPA y EPA.

- Este químico esta en la lista de sustancias especialmente peligrosas a la salud.

En listado por ser un **MUTAGENO**.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición al **Fenol**:

- Al contacto puede irritar severamente y causar quemaduras de la piel y ojos con posible daño ocular.

- Respirar los vapores de **Fenol** puede causar irritación de nariz y garganta.

- Respirar los vapores de **Fenol** puede irritar los pulmones y causar tos y /o disminuir la respiración. Las altas exposiciones pueden causar acumulación de líquido en los pulmones (edema pulmonar), una emergencia médica, con severa disminución en la respiración.

- Altos niveles pueden interferir con la capacidad de la sangre para acarrear oxígeno causando dolor de cabeza, fatiga, mareos, y color azul en la piel y labios (metahemoglobinemia)

- Altos niveles pueden causar problemas respiratorios, colapso y hasta la muerte.

- Altas exposiciones pueden causar dolor de cabeza, mareos, fatiga, desmayos, debilidad, náusea, vómitos y falta de apetito.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **Fenol** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

- **Fenol** causa MUTACIONES (cambios genéticos).

- No hay evidencia de que el **Fenol** cause cáncer en animales.

Esto está basado en los resultados de estudios publicados y disponibles presentemente en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey.

Peligros a la Reproducción

- De acuerdo a la información actualmente disponible en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey, **Fenol** ha sido estudiado y no se han demostrado efectos sobre la reproducción.

Otros Efectos a largo plazo

- **Fenol** puede irritar los pulmones. Exposiciones repetidas pueden causar bronquitis que se desarrolla con tos, flema y/o dificultades respiratorias.

HIDROXIDO DE SODIO

Número CAS: 1310-73-2

Resumen de Peligros:

- **Hidróxido de Sodio** puede afectar al ser respirado y por pasar a través de la piel.
- **Hidróxido de Sodio** es una sustancia química CORROSIVA y al contacto con piel y ojos puede causar irritación severa y quemaduras con posible daño ocular.
- Respirar los vapores del **Hidróxido de Sodio** puede irritar la boca, nariz y garganta.
- Respirar los vapores del **Hidróxido de Sodio** puede irritar los pulmones causando tos y disminución de la capacidad respiratoria. Exposiciones elevadas pueden causar acumulación de líquido en los pulmones (edema pulmonar), emergencia medica, con severos disminución de la respiración.

Razones para citarlo:

- Hidróxido de Sodio** esta enlistado entre las sustancias peligrosas por estar regulada por OSHA y ser citada por las siguientes instituciones: ACGIH, DOT, NIOSH, NFPA y EPA.
- Este químico esta en la lista de sustancias especialmente peligrosas a la salud.

En listado por ser **CORROSIVO**.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición al **Hidróxido de Sodio**

-El contacto puede causar irritación severa y quemaduras en la piel y ojos con posible daño ocular o nubosidad del ojo con pérdida de la visión.

- Respirar los vapores del **Hidróxido de Sodio** pueden irritar la boca, nariz y garganta.

- Respirar los vapores del **Hidróxido de Sodio** puede irritar los pulmones causando tos y disminución de la capacidad respiratoria. Exposiciones elevadas pueden causar acumulación de líquido en los pulmones (edema pulmonar), emergencia medica, con severos disminución de la respiración.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **Hidróxido de Sodio** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

-De acuerdo a la información disponible actualmente en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey, el **Hidróxido de Sodio** aún no ha sido estudiado su capacidad de causar cáncer en animales.

Peligros a la Reproducción

- No hay evidencia de que el **Hidróxido de Sodio** afecte la reproducción. Esto en base a los resultados de estudios publicados actualmente disponibles en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey.

Otros Efectos a largo plazo.

- Exposiciones a muy altas al **Hidróxido de Sodio** pueden causar daño pulmonar.

METANOL

Número CAS: 67-56-1

Resumen de Peligros:

Metanol puede afectar cuando es inhalada y al pasar a través de la piel.

Debe ser manejado CON EXTREMA PRECAUCION como un TERATOGENO

Puede causar irritación de la piel.

Razones para citarla:

Metanol esta en la lista de sustancias peligrosas por estar regulada por OSHA y ser citada por las siguientes instituciones: ACGIH, DOT, NIOSH, DEP, HHAG, NFPA y EPA.

Este químico esta entre las sustancias especialmente peligrosas. Enlistada por ser un TERATOGENO y es INFLAMABLE.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición al **Metanol**.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **Metanol** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

No existe evidencia de que el **Metanol** cause cáncer en animales. Esta basado en los resultados de las pruebas de estudios publicados disponibles actualmente por el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey.

Peligros a la Reproducción

Metanol puede ser un TERATOGENO en humanos desde que se ha observado que es teratógeno en animales.

Otros Efectos a largo plazo

El contacto repetido y prolongado puede causar resequedad y agrietamiento de la piel. **Metanol** puede causar daño en el hígado y en el sistema nervioso.

P- FENILENDIAMINA

Número CAS: 106-50-3

Resumen de Peligros:

- **p-Fenilendiamina** puede afectar cuando es inhalada y al pasar a través de la piel.
- Contacto puede irritar severamente y producir quemaduras en la piel y ojos con posible daño ocular. Repetidas exposiciones altas concentraciones pueden causar nubosidad en el lente del ojo (cataratas).
- Inhalar los vapores de **p-Fenilendiamina** pueden irritar la nariz, la garganta y los pulmones causando tos, estornudo y/o disminución de la respiración.
- Exposiciones a **p-Fenilendiamina** pueden causar dolor abdominal, náusea, elevar la presión sanguínea, mareos, ataques y hasta el coma.
- Altos niveles pueden interferir con la capacidad de la sangre para acarrear oxígeno causando dolor de cabeza, fatiga, mareos, y color azul en la piel y labios (metahemoglobinemia)
- Altos problemas pueden causar problemas respiratorios, colapso y hasta la muerte.
- Exposiciones a la **p-Fenilendiamina** pueden dañar los glóbulos rojos de la sangre causando anemia.
- **p-Fenilendiamina** pueden causar alergia en la piel. Si la alergia se desarrolla, futuras exposiciones leves pueden causar picazón y sarpullido.

-**p-Fenilendiamina** pueden causar un asma como alergia. Futuras exposiciones pueden causar ataques de asma con disminución de la respiración, estornudos, tos y/o cierre de la traquea.

- **p-Fenilendiamina** puede dañar el hígado y riñones.

Razones para citarla:

- **p-Fenilendiamina** esta enlistada entre las sustancias peligrosas por estar regulada por OSHA y ser citada por las siguientes instituciones: ACGIH, DOT, NIOSH, DEP y EPA.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición a la **p-Fenilendiamina**:

- Contacto puede irritar severamente y producir quemaduras en la piel y ojos con posible daño ocular. Repetidas exposiciones altas concentraciones pueden causar nubosidad en el lente del ojo (cataratas).

- Inhalar los vapores de **p-Fenilendiamina** pueden irritar la nariz, la garganta y los pulmones causando tos, estornudo y/o disminución de la respiración.

- Exposiciones a **p-Fenilendiamina** pueden causar dolor abdominal, náusea, elevar la presión sanguínea, mareos, ataques y hasta el coma.

- Altos niveles pueden interferir con la capacidad de la sangre para acarrear oxígeno causando dolor de cabeza, fatiga, mareos, y color azul en la piel y labios (metahemoglobinemia).

- Altos problemas pueden causar problemas respiratorios, colapso y hasta la muerte.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **p-Fenilendiamina** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

- No existe evidencia de que la **p-Fenilendiamina** causa cáncer en animales. Esto esta basado en los resultados de los estudios publicados y disponibles actualmente en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey.

Peligros a la Reproducción

- No existe evidencia de que la **p-Fenilendiamina** tenga efectos sobre la reproducción. Esto esta basado en los resultados de los estudios publicados y disponibles actualmente en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey.

Otros Efectos a largo plazo

- Repetidas exposiciones altas concentraciones pueden causar nubosidad en el lente del ojo (cataratas).

- Exposiciones a la **p-Fenilendiamina** pueden dañar los glóbulos rojos de la sangre causando anemia.

- **p-Fenilendiamina** pueden causar alergia en la piel. Si la alergia se desarrolla, futuras exposiciones leves pueden causar picazón y sarpullido.

-**p-Fenilendiamina** pueden causar un asma como alergia. Futuras exposiciones pueden causar ataques de asma con disminución de la respiración, estornudos, tos y/o cierre de la traquea.

- **p-Fenilendiamina** puede dañar el hígado y riñones.

4-NITROFENOL

Número CAS: 100-02-7

Resumen de Peligros:

- **4- Nitrofenol** puede afectar cuando es inhalada y al pasar a través de la piel.
- Contacto puede irritar severamente y producir quemaduras en la piel y ojos con posible daño ocular.
- Inhalar los vapores de **4-Nitrofenol** pueden irritar la nariz, la garganta y los pulmones causando tos, estornudo y disminución de la respiración.
- Altos niveles pueden interferir con la capacidad de la sangre para acarrear oxígeno causando dolor de cabeza, fatiga, mareos, y color azul en la piel y labios (metahemoglobinemia). Altos problemas pueden causar problemas respiratorios, colapso y hasta la muerte.
- Exposiciones al **4-Nitrofenol** pueden causar dolor estomacal, debilidad, confusión, palpitaciones rápidas y/o fiebre.
- Altas y repetidas exposiciones pueden afectar el sistema nervioso.
- **4-Nitrofenol** es un QUIMICO REACTIVO y con PELIGRO DE EXPLOSION.

Razones para citarla:

- **4- Nitrofenol** esta enlistada entre las sustancias peligrosas por estar regulada por OSHA y ser citada por las siguientes instituciones: DOT, NFPA, DEP, IRIS y EPA.

- Este químico está en la lista de sustancias especialmente peligrosas a la salud. Enlistada por ser REACTIVO.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición al **4- Nitrofenol**.

- Contacto puede irritar severamente y producir quemaduras en la piel y ojos con posible daño ocular.

- Inhalar los vapores de **4-Nitrofenol** pueden irritar la nariz, la garganta y los pulmones causando tos, estornudo y/o disminución de la respiración. Altos niveles pueden interferir con la capacidad de la sangre para acarrear oxígeno causando dolor de cabeza, fatiga, mareos, y color azul en la piel y labios (metahemoglobinemia). Altos problemas pueden causar problemas respiratorios, colapso y hasta la muerte.

Exposiciones al **4-Nitrofenol** pueden causar dolor estomacal, debilidad, confusión, palpitaciones rápidas y/o fiebre.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **4-Nitrofenol** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

-De acuerdo a la información actualmente disponible en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey, **4-Nitrofenol** ha sido estudiado y no se han demostrado su capacidad de producir cáncer.

Peligros a la Reproducción

-De acuerdo a la información actualmente disponible en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey, **4-Nitrofenol** ha sido estudiado y no se han demostrado tenga efectos sobre la reproducción.

Otros Efectos a largo plazo

4-Nitrofenol puede irritar los pulmones. Repetidas exposiciones pueden causar bronquitis que se desarrolla con tos, flema y/o disminución de la respiración.

Altas o repetidas exposiciones pueden afectar el Sistema nervioso.

SULFATO DE ZINC

Número CAS: 7733-02-0

Razones para citarla:

- **El Sulfato de Zinc** esta en la lista de sustancias peligrosas por ser citada por las siguientes instituciones: DOT, DEP y EPA.

Información de Peligros a la Salud.

Efectos agudos a la salud.

Los siguientes efectos agudos (a corto plazo) en la salud pueden ocurrir inmediatamente o poco después de la exposición al **Sulfato de Zinc**.

- **Al contacto puede irritar y quemar la piel.**

- El Contacto con **Sulfato de Zinc** puede irritar severamente y quemar los ojos con posible daño ocular.

- Inhalar los vapores de **Sulfato de Zinc** puede causar irritación de la nariz, garganta causando tos, estornudos.

- Exposición al **Sulfato de Zinc** puede causar dolor de cabeza, mareos, nauseas y vomito.

Efectos Crónicos a la Salud

Los siguientes efectos (a largo plazo) en la salud pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al **Sulfato de Zinc** y pueden durar por meses o años:

Peligro de Cáncer

- No existe evidencia de que el **Sulfato de Zinc** cause cáncer en animales. Esta basado en los resultados de las pruebas de estudios publicados disponibles actualmente por el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey.

Peligros a la Reproducción

De acuerdo a la información actualmente disponible en el Departamento de Salud y Servicios Superiores del Estado de New Jersey, **Sulfato de Zinc** no ha sido estudiado para demostrar que tenga efectos sobre la reproducción.

Otros Efectos a largo plazo

Contacto prolongado o repetido puede causar sarpullido, resequedad en la piel y enrojecimiento.