



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**"DETERMINACION DE FUENTES CONTAMINANTES DE FENOL
EN LECHE PASTERIZADA Y ENVASADA"**

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

Carlos Rodríguez Valtierra

MEXICO, D. F.

1 9 8 0

M-23538



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Prof. Natalia Salcedo Olavarrieta.
VOCAL Prof. Enrique García Galiano.
SECRETARIO Prof. Emilio Barragán Hernández.
1er. SUPLENTE Prof. Gilberto F. Villela Téllez.
2do. SUPLENTE Prof. Agustín López Munguía Canales.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Leche de la Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos de la --
S.S.A.

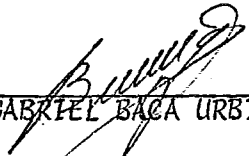
SUSTENTANTE


CARLOS RODRIGUEZ VALTIERRA

ASESOR DE TEMA


Q. M. en C. NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA

ASESOR TECNICO


ING. GABRIEL BACA URBINA

A MIS PADRES:

SR. SAMUEL RODRIGUEZ SANCHEZ

SRA. CAROLINA VALTIERRA DE RODRIGUEZ

Con cariño y agradecimiento.

A MIS HERMANOS:

ANA MARIA *y* ANGEL.

A MARIA DE LA LUZ GONZALEZ V.:

Con amor.

*Con gratitud y reconocimiento, a mi
Asesor Técnico:*

*Sr. Ing. Gabriel Baca Urbina, Coordinador
del Laboratorio de Leche, dependiente de la Di-
rección General de Control de Alimentos, Bebi-
das y Medicamentos de la S.S.A., por sus aten-
ciones, apoyo y acertadas observaciones con que
me guió en la realización de esta Tesis.*

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III. HIPOTESIS PROPUESTAS	8
IV. ASPECTOS FILOSOFICOS DEL DISENO EXPERIMENTAL PARA PRUEBA DE HIPOTESIS	9
V. DISENO EXPERIMENTAL DE HIPOTESIS - PROPUESTAS	14
VI. DETERMINACION DEL NUMERO DE MUES---TRAS EN LOS EXPERIMENTOS, PARA LA - COMPROBACION DE CADA UNA DE LAS HIPOTESIS	27
VII. METODOLOGIA EMPLEADA	33
- METODO DE SANDERS Y SAGER	
- CUENTA ESTANDAR	
- PRUEBA PARA FOSFATASA REACTIVADA Y RESIDUAL	
VIII. ASPECTOS ESTADISTICOS	54
- METODO DE MINIMOS CUADRADOS	
- METODO DE PARES DE PUNTOS	

	Pág.
IX. RESULTADOS	60
X. CONCLUSIONES	71
XI. BIBLIOGRAFIA	72

INTRODUCCION

La Secretaría de Salubridad y Asistencia es, en México, el organismo encargado de cuidar la salud pública en sus múltiples aspectos. Uno de estos aspectos es la vigilancia sanitaria de los alimentos. La ley otorga a este organismo la facultad de hacer inspecciones cuantas veces lo considere necesario a las instalaciones productoras de alimentos y, asimismo, el poder sancionar económicamente a los productores por las faltas en que pudieran haber incurrido.

Para ejercer estas acciones, la S.S.A. está dotada de ciertos mecanismos legales y técnicos, que la habilitan en el cumplimiento del cuidado de la salud pública.

Dentro de los mecanismos técnicos con que cuenta la S.S.A., se encuentran los laboratorios de análisis químicos y bacteriológicos, quienes son los encargados de ejercer una apreciación de la calidad sobre todos los alimentos, pero desde el punto de vista estrictamente sanitario, es decir, se encargan de analizar los alimentos para verificar que cumplan con las normas sanitarias actuales.

El primer paso dentro del esquema de vigi--

lancia sobre los alimentos ejercido por la S.S.A. es justamente tomar una muestra aleatoria del alimento en cuestión y trasladarla al laboratorio para el análisis correspondiente. Después de que el laboratorio emite un resultado, el siguiente paso es la revisión o dictamen del resultado por personal especializado, quien decide si se ha incurrido en alguna violación al reglamento vigente, y finalmente, existe una tercera etapa donde se sanciona económicamente al infractor.

Aunque parezca sencillo que el encargado de la toma de decisiones del sistema sea quien juzgue si se ha incurrido en una falta que amerite sanción, en muchos casos no es fácil, y es precisamente aquí donde surge el dilema que se puede definir básicamente como un criterio de decisión.

Uno de los alimentos analizados por la S.S.A., es la leche. Dentro de las pruebas practicadas a este alimento está la cuantificación de la actividad de una enzima que posee la leche cruda, llamada fosfatasa alcalina. La importancia de este análisis reside en el hecho siguiente: toda la leche envasada que se expenda al público debe haber sido pasteurizada, es decir, sujeta a un proceso término que asegure la destrucción de Coxiella burneti. Al someter la leche -

cruda a pasteurización, primero se destruyen los microorganismos patógenos, inmediatamente des--
 pués se inactiva la enzima mencionada; ^{Por el efecto del calor en} de hecho, se han destruido los posibles patógenos que la leche cruda pudiera haber tenido. ^{Si no es así los no activan la enzima} Así, el análisis es una medida indirecta del riesgo que tiene el consumidor de leche de ingerir bacterias patógenas como Mycobacterium tuberculosis. ^{Producción de fenol}

La forma de realizar dicho análisis es la siguiente: se ha aprovechado la facultad química que tiene la fosfatasa alcalina activa para desprender fenol de un sustrato tal como el fenil fosfato disódico. Por lo que en el análisis se procede a colocar una muestra de leche, supuestamente pasteurizada, en condiciones apropiadas, en presencia de fenil fosfato disódico. Si la leche ha sido bien pasteurizada, la enzima fosfatasa estará inactivada y no podrá desprender el fenol del sustrato agregado; si por lo contrario, la leche ha sido mal pasteurizada, la fosfatasa tendrá cierto grado de actividad y desprenderá cierta cantidad de fenol del sustrato agregado. Este fenol, a su vez, se hace reaccionar con un complejo conocido como dibromo quinona clorimida (BQC) cuya reacción con el fenol produce una coloración azul; la intensidad de coloración se mide en un aparato óptico llamado espectrofotóme--

tro. Si la enzima se ha inactivado (leche bien pasterizada) se produce una coloración café, y - la medición de la intensidad de color azul (leche mal pasterizada) indica qué tan bien se ha pasterizado la leche, y como se dijo anteriormente, es una medida indirecta del riesgo que tiene el consumidor de leche de ingerir microorganismos patógenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es precisamente en la forma de medir este riesgo de salud pública en donde surge el dilema a resolver. Dentro del esquema planteado, existe una persona que toma decisiones y está encargada de sancionar el resultado del análisis. Si este resultado no es correcto, además de sancionar económicamente al productor de leche en cuestión, el encargado de tomar las decisiones está consciente de que se ha vendido un producto que constituye un riesgo para la salud pública.

El dilema reside en el hecho siguiente: dado que el método de medir la actividad de la fosfatasa es un método indirecto, que a fin de cuentas cuantifica la intensidad de un color azul, - este puede producirse por varias causas (reportadas en la literatura), distintas a una mala pasteurización, que es la verdadera causa real de un riesgo para la salud pública; no todos los resultados alterados de la prueba se deben sancionar, ni mucho menos constituyen un riesgo para el consumidor. De esta forma, la persona encargada de la toma de decisiones, como no sabe a la fecha - cuál es la causa real de estos resultados fuera de reglamento, seguramente ha sancionado a muchos que no lo merecían y seguramente, también,

ha permitido la venta de mucha leche que sí constituye un verdadero riesgo para la salud pública.

El objetivo a seguir es justamente determinar cuál o cuáles de estas causas (incluyendo - una mala pasterización), son el origen de los resultados anormales y poder así emitir un dictamen adecuado que no perjudique ni al productor - con una sanción injusta, ni a la salud pública - con un riesgo de enfermedades.

Las causas de las posibles alteraciones de los resultados se pueden dividir en tres: 1) error en el análisis, 2) en el proceso de la leche, y 3) en una mala pasterización.

Dado que el color azul indica un mal resultado, que se produce por la presencia de fenol, éste puede provenir de una fuente externa distinta a la que desprende la fosfatasa a partir de - fenil fosfato disódico.

Las causas de alteración son las siguientes:

1) Error en el análisis.

a) Contaminación de fenol en el análisis, - principalmente residuos de detergente en el material de laboratorio mal enjuagado.

b) Contacto de cualquier reactivo o de la - leche misma, con partes del recipiente que con-

tengan fenol, como tapones de hule.

c) Contacto de cualquier reactivo, o de la leche misma, con las manos del analista que contienen fosfatasa.

2) En el proceso de la leche.

d) Contaminación de la leche con fenol, -- principalmente al vaciarla en un tanque mal en--juagado (con residuos de detergente).

e) Contaminación de la leche con fenol por contacto del producto con las gomas muy desgastadas de la llenadora (las gomas son de hule que contiene fenol).

f) Residuos de detergente en las botellas - mal enjuagadas.

g) Reactivación de la fosfatasa, fenómeno natural. Existe la prueba para determinar si la fosfatasa se ha reactivado.

h) Leche con alto grado de contaminación bacteriana. Las bacterias producen fosfatasa.

i) Mala pasteurización, propiamente dicha, - por estado deficiente del equipo de elaboración.

j) El fenol que contiene el abrillantador de botellas, aunque en pequeñas cantidades, debe tomarse en cuenta.

HIPOTESIS PROPUESTAS

En base a lo anteriormente mencionado, se proponen 5 hipótesis:

1) El origen de los resultados fuera de reglamento se debe a errores en el análisis.

2) El origen de los resultados fuera de reglamento se debe a contaminación de fenol durante el proceso de pasteurización de la leche.

3) El origen de los resultados fuera de reglamento se debe a causas naturales.

4) El origen de los resultados fuera de reglamento se debe a una mala pasteurización del producto.

5) El origen de los resultados fuera de reglamento se debe a una combinación de cualquiera de los cuatro incisos anteriores.

ASPECTOS FILOSOFICOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA PRUEBA DE HIPOTESIS

Dependiendo del tipo de hipótesis que se quiera probar, dependerá el enfoque filosófico que se le dé al diseño. Aquí el tipo de problema-hipótesis es causa-efecto y por tanto, para diseñar el experimento de prueba se debe usar el enfoque lockeano. Este enfoque no necesita el desarrollo de una teoría formal, ni de justificación de modelos para emitir y tratar de probar una hipótesis, sólo basta, para este fin, usar justificaciones estadísticas, obtener la confiabilidad de los datos y señalar los límites de confianza. Desde el punto de vista lockeano, esto es suficiente para aceptar o rechazar una hipótesis dada.

Sin embargo, el tipo de problema es, en primera instancia, de causa-efecto y no se puede decir, de ningún modo, que las hipótesis propuestas sean todo lo que se puede y se debe investigar, es decir, se han mencionado algunas causas productoras del efecto, pero no todas y puede haber sin duda otras tantas aún no mencionadas. Si se quiere investigar desde dicho punto de vista, se deberá emplear el enfoque kantiano. Esto implica que, además de la aportación de datos esta

dísticos, se debe tener el juicio de expertos y la justificación teórica para proponer alternativas con el objeto de reforzar las hipótesis presentadas o bien, para emitir nuevas hipótesis sobre el asunto. Esto, por supuesto, amplía el horizonte de observación del fenómeno, lo cual sin duda es benéfico al tratar de conocer la verdad.

Existe aún otro punto de vista filosófico - sobre el tema mencionado susceptible de ser empleado; este enfoque es el singeriano. Si se quiere emplear esta forma de pensamiento, se tendría que poner en duda si la hipótesis está en sí bien planteada, si los objetivos están correctamente señalados y aún si el asunto es realmente importante como para tomarse en cuenta, es decir, si no está enfocado desde un punto de vista muy particular y equivocado.

Aunque esta forma de pensamiento es digna - de tomarse en cuenta, no se hará ningún tipo de intento para demostrar si se tiene razón o no al pensar de esta forma. Sólo se puede decir que hay ciertos factores que inducen a dudar de la investigación que se pretende. Presuponemos que hay un riesgo de salud pública al ingerir leche que pueda llevar bacterias patógenas, pero uno se puede preguntar lo siguiente sobre la leche que está mal pasteurizada, ¿cuántos litros de le-

che contienen Coxiella burneti?, hay que tomar en cuenta que estando Coxiella burneti presente en la leche, puede existir Mycobacterium tuberculosis, si es que hay vacas tuberculosas y en realidad hay muy pocas, por la simple inconveniencia económica de mantener a un animal enfermo con baja producción. Otra pregunta sería: de la gente que llega a comprar leche mal pasterizada con Mycobacterium tuberculosis, si la ingiere ¿qué tan peligroso sería para su salud?. Es bien sabido que la tuberculosis sólo ataca a personas de escasa resistencia física; la gente susceptible a tuberculosis generalmente es de escasos recursos, que con seguridad ni siquiera toma leche. Además de esto, ¿cuánta gente que compra la leche la hierve antes de tomarla?; este hecho de hervir la leche destruiría completamente a Coxiella burneti y por tanto a Mycobacterium tuberculosis, así como a otros microorganismos susceptibles a provocar enfermedades.

Con estas preguntas se está sugiriendo que probablemente no es tanto el peligro para la salud pública en los términos mencionados como se pensó en un principio. Tal vez una mejor solución sería hacer efectivo el programa tendiente a la vigilancia de tuberculosis en el ganado vacuno de todo México. Con esto no se quiere de-

ción que se permita consumir leche mal pasteurizada con el consentimiento de las autoridades de la S.S.A. Inicialmente, la pasteurización fue establecida no sólo con el objeto principal de eliminar a Mycobacterium tuberculosis, sino también a bacterias como Brucella abortus, Staphylococcus aureus, coliformes, etc.

Esto puede tener graves implicaciones sobre el reglamento sanitario vigente. [La norma actual para la prueba de cuantificación de fosfatasa, copiada de reglamentos americanos, (3), es "no más de 4 unidades de fenol por ml de leche". La precisión de la prueba consiste en poder determinar hasta un 0.2% de leche mal pasteurizada, es decir, si 0.2% del volumen total de producción de leche está mal pasteurizado, el resultado de la prueba estará por arriba del límite permitido de 4 unidades de fenol por ml de leche, y sujeta a sanción. Ahora, supongamos que el análisis de una leche reporta un resultado de por ej., 20 unidades de fenol por ml de leche, ¿cuál es el riesgo para la salud pública contemplado ahora desde el punto de vista de que no se hayan eliminado todas las bacterias patógenas?, para poder contestar esto se requiere de otro estudio por separado, para determinar valores mínimos de tiempo y temperatura que destruyan no sólo a Co-

xiella burnetii y Mycobacterium tuberculosis, sino también a todas las bacterias patógenas.

Como se ve, el enfoque singeriano puede ser útil en el planteamiento del asunto de que se trata. Sin embargo, ya se mencionó que el objeto del trabajo no es contestar a este tipo de preguntas, sino sólo mencionarlas como parte del orden que emplea el método científico en la investigación.

DISEÑO EXPERIMENTAL DE HIPÓTESIS PROPUESTAS

Diseño experimental para hipótesis 1.

El enunciado de esta hipótesis se basa en los errores humanos que pueden ser una de las causas de alteración de resultados; sin embargo, estos errores se pueden superar con cierta facilidad, si se consideran los siguientes puntos:

a) No tomar muestras de leche en recipientes que contengan tapones de hule o de baquelita.

b) No mantener los reactivos químicos en recipientes que contengan tapones de hule.

c) Enjuagar perfectamente todo el material de vidrio, frascos de muestra, frascos de reactivos, pipetas, etc., con agua destilada.

d) Evitar el contacto de las manos, ya sea con la leche o con los reactivos.

Es claro que, por mucho que se cuide una rutina de análisis, con el tiempo, y dada la monotonía del trabajo, siempre se llegarán a cometer errores; esto es, hay que evitar las causas de error, pero esto no implica que no se cometerá un error. Lo más recomendable sería determinar el valor de la esperanza matemática de unidades de fenol debido a errores en el análisis. No obs

tante, la técnica de análisis permite eliminar - este error o en todo caso minimizarlo, "corriendo una muestra en blanco" en la serie de análisis, que consiste en lo siguiente: en este tipo de análisis normalmente no se analiza una sola muestra, sino un lote de ellas. Dentro del lote analizado se coloca una muestra que en lugar de leche contiene agua destilada, por supuesto exenta de fenol, sometiéndosele a la misma serie de análisis que a una muestra de leche. Al hacer - la lectura final de intensidad de color, la intensidad o cantidad de color que pudiera dar esta muestra en blanco, se resta de la lectura de color de todas las muestras analizadas en ese lote, con lo cual prácticamente se evita el error que pudiera dar el análisis en sí.

Diseño experimental para hipótesis 2.

Para probar esta hipótesis, es necesario tomar en cuenta los errores e ignorancia de las - personas encargadas del aseo del equipo en las - plantas productoras.

Se procederá a seleccionar alrededor de 5 - plantas productoras de leche que hayan tenido - problemas continuos en el aspecto mencionado. Se les dará a conocer la hipótesis que se tiene sobre los resultados fuera de reglamento. Las con

diciones que se tomarán en consideración, serán las siguientes:

a) Vigilar el enjuague de los tanques y --- cualquier recipiente con el que vaya a estar en contacto la leche, como el pasterizador, llenadoras, etc.

b) Vigilar el estado de las gomas de las - llenadoras.

c) Vigilar el estado de las botellas des--- pués de su lavado.

El programa de muestreo será el siguiente:

Salida del pasteurizador.

Tanque almacenador.

Envase vacío.

Envase lleno.

	D_1	D_2	D_3	D_4	-----	D_N		D_1	D_2	D_3	-----	D_N		D_1	D_2	D_3	-----	D_N		D_1	D_2	D_3	-----	D_N	
R_1																									
R_2																									
R_3																									
⋮																									
R_N																									

Se reportará la actividad de fosfatasa como unidades de fenol por ml de leche y en el caso - del envase vacío, para hacer la prueba se llenará el envase con un litro de agua exenta de fenol y se reportará como unidades de fenol por ml. Se usará el método oficial americano (Sanders-Sa ger), ya que en México no existe un método oficial aprobado en el reglamento sanitario. (3).

Se considera que:

Unidades de fenol de leche envasada = unida des de fenol de salida de pasterizador + unida-- des de fenol en el tanque de almacén + unidades de fenol de envases vacíos.

Si se observa que no se mantiene la rela--- ción anterior, habrá que buscar otras causas dis tintas a las mencionadas, o bien pensar nuevamente que el análisis o método son incorrectos.

En caso de que todas las pruebas salieran - con cero unidades de fenol por ml de leche, se - desechará la hipótesis 2.

Además de las precauciones tomadas para com probar la hipótesis 1, en ésta se deberán tener los siguientes cuidados:

a) Comprobar que la leche ha sido pasteriza da correctamente, observando la temperatura de - pasterización. Se supondrá que el tiempo de pas

terización es el correcto, pues no existen los - elementos suficientes para comprobarlo.

b) Transportar la leche desde el lugar de - toma de muestra hasta el laboratorio donde se - analizará, manteniéndola en hielo, para evitar - en lo posible la proliferación bacteriana.

c) Realizar el transporte de la leche para su análisis en el menor tiempo posible, para evitar la reactivación de la enzima. Si se trans-- porta la leche por debajo de 4°C y se analiza en no más de 5 horas a partir del momento de la to- ma de muestra, se evita la reactivación de la en- zima y la proliferación bacteriana es casi nula.

Si a la salida del pasteurizador se observa una elevada actividad de la enzima, se sospechará entonces de una pasteurización deficiente.

Si el experimento se lleva a cabo en forma estricta y desaparecen las elevadas cuentas de - actividad de la enzima, se podría pensar que el desajuste se debía a fallas humanas y, desde este punto de vista, no deberían ser sancionados - los productores.

Diseño experimental para hipótesis 3.

a) Reactivación de fosfatasa.

Una fosfatasa que inicialmente ha sido inac

tivada por efecto del calor en la pasterización puede volverse activa nuevamente al permanecer - la leche a elevada temperatura (arriba de 15°C) durante varias horas (más de 8).

Esta situación se presenta debido a que la leche, desde que sale de la planta productora hacia su reparto, queda prácticamente sin refrige-
ración. Una gran parte de este producto se expen-
de en tiendas que son poco confiables en cuanto al cuidado de la leche. Si se toma una muestra - de una de estas tiendas (de las cuales hay miles en el D.F.) existe una alta probabilidad de reac
tivación de la fosfatasa. Para ver la incidencia de este fenómeno, se deberá muestrear de estas -
tiendas y en aquellas en las que las muestras - den resultados de análisis fuera de reglamento, se les practicará la prueba de reactivación, se procederá a calcular un estimador del grado de -
confianza alcanzado con el muestreo. Para esto - se usará la distribución de Poisson, ya que la -
incidencia de la reactivación es totalmente alea
toria. (10).

No deberá confundirse el hecho de que encon
trar un resultado fuera del reglamento en leches muestreadas en tiendas, se deba a una pasteriza-
ción deficiente. La razón de practicar un análi
sis extra por la reactivación de fosfatasa, jus-

tamente indica la diferencia; es decir, de las - muestras tomadas en tiendas, en las que el resul tado sea anormal se practicará la prueba de reac tivación y si ésta es positiva, se tendrá la cer teza de que hubo reactivación; de lo contrario, la causa puede ser cualquiera de las mencionadas anteriormente.

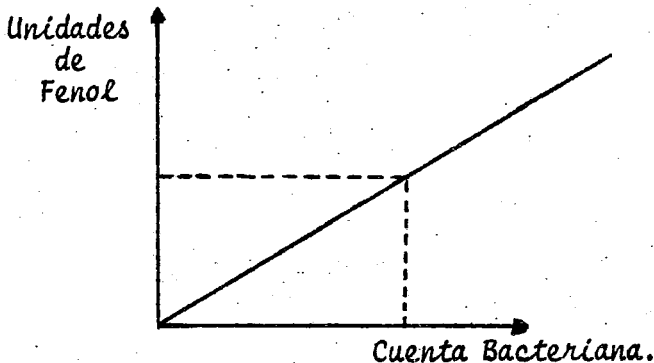
b) Pruebas positivas para fosfatasa microbiana.

La fosfatasa es una enzima que se encuentra presente en todo ser vivo, por tanto las bacte-- rias de cualquier tipo también la producen como parte de sus procesos vitales. Si la leche anali zada contiene un alto grado de contaminación bac-- teriana, es posible que el análisis revele acti-- vidad de fosfatasa debida a la fosfatasa micro-- biana, lo cual, por supuesto, no debe ser objeto de sanción. Sin embargo, hasta la fecha no hay un método o procedimiento que permita descubrir si un resultado de análisis fuera de reglamento al cuantificar fosfatasa, se debe exclusivamente a la fosfatasa producida por las bacterias.}

Como un intento para decidir esta cuestión, se deberá hacer lo siguiente:

Se está suponiendo, en principio, que son - dos variables relacionadas, quizá en forma li-- neal, en este caso, la variable "unidades de fe-- nol", dependiendo de la variable "cuenta bacte-- riana". Se procederá a la construcción de una -

curva que muestre la relación de las variables. Se deberá partir de una leche que tenga cero unidades de fenol y se dejará "envejecer" para que prolifere y aumente su cuenta bacteriana, a un grado tal, que abarque una escala muy amplia de esta cuenta, por ejemplo, de 50,000 colonias por ml hasta 4 000 000 de colonias por ml; a cada una de estas muestras se le cuantificarán también las unidades de fenol por ml de leche, graficando cada par de datos. También es necesario hacer la prueba de reactivación a cada una de estas leches, excluyendo las que den resultados positivos a esta prueba. Probablemente se obtenga una gráfica como la siguiente:



Es posible que al encontrarse que los resultados van de cero hasta una cantidad de colonias C_1 se produzca una cierta cantidad de unidades - de fenol F_1 , que corresponde al límite máximo admitido por el reglamento. Si se llegara a una conclusión de este tipo, tendría que reglamentarse esta correlación y admitir que, a partir de cierto número de colonias que contenga la leche, la cuantificación de la actividad de la fosfatasa pierde validez.

Diseño experimental para hipótesis 4.

La única causa de que exista una mala o deficiente pasteurización del producto, se debe exclusivamente a un mal funcionamiento del equipo. Todos los pasteurizadores poseen como norma de fabricación una válvula llamada "desviadora de flujo", su función consiste en que si ocurre un imprevisto durante el funcionamiento del pasteurizador, por ejemplo, una falla eléctrica o una decompostura de la caldera que provee el agua caliente necesaria en la pasteurización, la válvula desviadora de flujo se cierra e impide el flujo normal de la leche, regresando la leche cruda de forma que recircule. Esta válvula se debe cerrar cuando la temperatura de pasteurización baja de los 72.5°C y actúa automáticamente.

Si no existiera la mencionada válvula, una falla similar a cualquiera de las anotadas haría que pasara la leche cruda hacia el tanque de almacenamiento de leche pasteurizada, con lo cual - no tendría sentido pasteurizar.

Por lo tanto, se observa que la válvula desviadora de flujo juega un papel muy importante - con respecto a la calidad de la pasteurización, - en el sentido de asegurar que no se mezcle la leche cruda con la pasteurizada.

La válvula desviadora de flujo está sujeta a las siguientes fallas:

La respuesta termométrica puede estar mal; esto se refiere a que no cierre al paso de la leche cuando la temperatura baja de 72.5°C o que - tarde un poco en hacerlo, es decir, la respuesta de la válvula debe ser tan precisa a los cambios de temperatura, que impida con una seguridad de un 100% el paso de la leche cruda al bajar la - temperatura.

Por otro lado, la respuesta termométrica - puede ser adecuada, pero el asiento de la válvula puede estar mal o el empaque de hule que posee la válvula puede estar muy gastado; ambas - causas permitirían el paso de leche cruda, aun- que sea en una cantidad mínima, al bajar la tem-

peratura. Recuérdese que el límite reglamentario en unidades de fenol al cuantificar fosfatasa equivale a un 0.2% de leche cruda sobre la leche pasterizada.

Existen otras causas que provocarían la mezcla de leche cruda con leche pasterizada. Las más comunes son: rotura de un empaque interno del pasterizador produciendo el mismo efecto. Su puestamente, como norma de fabricación dentro del pasterizador, la leche pasterizada tiene -- siempre una presión absoluta mayor que la leche cruda, precisamente para evitar esta mezcla; es decir, en caso de picadura de una placa o de la rotura de un empaque, la leche pasterizada pasaría al flujo de leche cruda y no al contrario. Sin embargo, existen aproximadamente 40 marcas de leche que se venden en el D.F., de éstas por lo menos un 50% tiene equipos de pasterización muy antiguos y es probable que en malas condiciones, por lo tanto, difícilmente trabajarán como un equipo nuevo y su probabilidad de falla será mayor.

Para comprobar si el resultado fuera de reglamento se debe a cualquiera de las causas mencionadas de este inciso, pero exclusivamente por mal funcionamiento del pasterizador, se deberán tomar muestras a la salida del pasterizador ha--

ciendo funcionar la válvula desviadora de flujo. Esto se deberá hacer en forma individual en las plantas productoras que presenten fallas en este aspecto. Si se comprobara que, en efecto, el pasterizador funciona defectuosamente, se le hará saber al interesado para la reparación inmediata del equipo. No es objeto del presente trabajo determinar la causa real por la cual no funciona bien el pasterizador, sino simplemente el origen de la falla, en este caso el pasterizador.

DETERMINACION DEL NUMERO DE MUESTRAS EN LOS EXPERIMENTOS PARA LA COMPROBACION DE CADA UNA DE LAS HIPOTESIS

Hipótesis 1. No se necesita determinar un cierto número de muestras, ya que se puede eliminar totalmente el error en el análisis por la simple observación estricta de los cuidados mencionados.

Hipótesis 2. En este supuesto, también es fundamental el elemento humano. Si se siguen con mucho cuidado las indicaciones dadas, es suficiente para considerar que un resultado anormal no se debe a la hipótesis supuesta. La única parte del experimento que debe vigilarse estrictamente es la del envase vacío. El camino que sigue una botella sucia y vacía en la planta es el siguiente: Llega un camión con una gran cantidad de botella sucia y la almacena en un lugar cercano a la lavadora de botellas. De ahí se van tomando para pasarlas al lavado, y al salir, ya lavadas, pasan sin interrupción por una banda transportadora hacia la llenadora de leche. La lavadora es un sitio muy sucio y sujeto a múltiples fallas, ya que muchas de ellas son piezas de equipo muy viejo. La lavadora en su funcionamiento pasa primeramente a las botellas por un baño caliente de sosa o detergente adecuado, des

pués las enjuaga con agua caliente, luego con --
agua fría y por último otro enjuague final con --
una solución bactericida, que puede ser de 120 --
ppm de hipoclorito de sodio, 25 ppm de yodo o 20 --
ppm de sales cuaternarias de amonio. Por tanto,
la botella puede ser la causante de resultados --
anormales en la cuantificación de actividad de --
fosfatasa por contaminación con fenol, por las --
siguientes causas:

- Enjuague deficiente del detergente dentro --
de la botella, ya sea por obstrucción de un as--
persor de enjuague o por baja presión del agua --
del enjuague en forma momentánea.

- Por una solución concentrada de solución --
bactericida con la cual se enjuaga el interior --
de la botella, por una falla del dosificador de --
la solución bactericida.

La ocurrencia de estas causas es totalmente
aleatoria y los eventos son independientes. Por
lo anterior, se podría calcular la probabilidad
de ocurrencia de que estas causas provocaran un
resultado anormal, es decir, se muestrea un núme
ro " n " de botellas vacías, se cuantifican las
unidades de fenol y se toma como resultado posi-
tivo aquel que rebase el límite reglamentario. --
Si se usa la distribución binomial.

$$Pr (X=i) = \binom{n}{i} p^i q^{n-i} \quad i = 0, 1, 2, \dots, n$$

$$= \frac{n!}{i! (n-i)!} p^i q^{n-i}$$

Donde $x = i$, la probabilidad de que al analizar una botella vacía el resultado sea anormal. De aquí se puede calcular un estimador puntual:

$$\hat{p} = \frac{\sum_{i=1}^n i X_i}{n}$$

Si se hiciera tender " n " a infinito, el estimador " p " tendería a estabilizarse en un valor dado. Sin embargo, como " n " no se puede hacer un número infinito de veces, se debe calcular un intervalo de confianza para el número de pruebas que se realicen.

Según Hoel (1), llega a la siguiente conclusión: elige un grado de confianza de 95%, emplea la aproximación normal a la binomial y obtiene la siguiente fórmula para trabajar con intervalos de confianza de 95%.

$$\left[\frac{x}{n} - \frac{1}{\sqrt{n}}, \quad \frac{x}{n} + \frac{1}{\sqrt{n}} \right]$$

Esto quiere decir que el 95% de las veces, el intervalo calculado incluirá el valor de --- " p ".

En el experimento en cuestión, se desconocen a " n " y " p ", " n " dependerá del ancho del intervalo que se desee. Por tanto, determínese de esta forma el número de experimentos o pruebas a realizar.

Hipótesis 3.

a) Reactivación de la fosfatasa. Se puede considerar que también éste es un evento totalmente aleatorio, ya que no se puede predecir la temperatura a la que permanecerá la leche después de salir de la planta ni el tiempo en que permanecerá así. Considerando, además, que las condiciones en que fue mantenida cada muestra tomada en las tiendas son independientes unas de otras, nuevamente se puede hacer un razonamiento como en la hipótesis 2 y obtener un estimador puntual.

$$\hat{p} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Y calcular el número de muestras para obtener un intervalo de confianza de 95% con la fórmula:

$$\left[\frac{x}{n} - \frac{1}{\sqrt{n}} , \frac{x}{n} + \frac{1}{\sqrt{n}} \right]$$

b) Fosfatasa microbiana. Como aquí el objeto es obtener una curva de correlación entre dos variables, se deben realizar las pruebas necesarias para obtener suficientes puntos sobre la gráfica que permitan calcular la pendiente y la ordenada al origen de la curva obtenida. En caso de obtener puntos muy dispersos en la gráfica, obténgase el coeficiente de correlación. Si está muy alejado de $+1$ ó -1 , deséchese esta hipótesis.

Hipótesis 4. El evento que podría verificar esta hipótesis sería el de una falla mecánica. Como ya se mencionó, los equipos están diseñados para tener una probabilidad de falla bajísima. En este caso, la falla sería una operación inadecuada de la válvula desviadora de flujo. Las otras fallas serían, la picadura de una placa o picadura de un empaque, no tienen probabilidad de ocurrencia, desde el punto de vista en que se ataca el problema, es decir, si se muestrea a la salida del pasterizador y hay cualquiera de estas fallas, el resultado del análisis siempre será malo y si la operación del equipo es adecuada, el resultado del análisis siempre será correcto. Por tanto, es evidente que se está tratando de verificar la operación de un sistema mecánico y no se trata de calcular la po

sibilidad de descompostura del equipo. Si el --
equipo está mal, se descubrirá al primer mues---
treo. Sin embargo, siguiendo las instrucciones
dadas de tomas de muestra, bastará realizar de -
10 a 15 muestreos para determinar si el funcionam
miento del equipo es realmente el correcto.

METODOLOGIA EMPLEADA

Determinación de fosfatasa en el laboratorio.

Existen muchos métodos para la determinación cuantitativa de la enzima, tales como el de Kay-Graham (1933), el de Aschaff-Fenburg-Mullen - muy usado en Europa. Los de la ciudad de Nueva York, el de Schrarer, los del A.O.A.C. I y II.

Determinación de fosfatasa por el método de Schrarer

Insistiendo de modo especial en la precaución de no contaminar la muestra con fosfatasa o fenol, para lo cual es indispensable que el equipo que entre en contacto con la leche (pipetas, frascos, matraces, etc.) se limpien con jabones o detergentes exentos de fenol y cuidadosamente enjuagados con agua destilada, es conveniente además sumergirlos en agua a 82°C, por lo menos durante 10 minutos antes de efectuar la prueba. Evítese el uso de tapones de plástico, porque es muy frecuente que éstos estén fabricados con derivados fenólicos.

Preparación de la muestra.

Evítese poner antisépticos: sólo en caso ne

cesario se puede usar cloroformo en proporción - de 1 a 3%.

Equipo necesario.

Tubos de ensayo de 10 X 110 mm. calibrados, de 5.0, 5.5 y 7.5 ml.

Tapones de hule.

Goteros.

Frascos goteros.

Baño de agua a temperatura regulable.

Testigos de comparación que se pueden conseguir en el Applied Research Institute de Nueva York, EE.UU.

Reactivos empleados.

1) Alcohol butílico normal, neutro, incoloro, punto de ebullición de 116-118°C exento de ácidos y ésteres.

2) 2,6 dibromoquinona clorimida (BQC) (nueva nomenclatura: N,2,6-tribromo-p-benzoquinoinmina), especial para trabajar con fosfatasa - (se puede obtener en Eastman Kodak Chemical, Rochester 3, N.Y.).

Disolver 30 mg de BQC en 10 ml de alcohol etílico o metílico. Consérvese en botella ámbar en refrigeración. No se use esta solución des--

pués de una semana de preparada.

3) *Sustrato amortiguador.* Disuelva en agua 0.5 g de fenil fosfato disódico exento de fenol, añada 25 ml de una solución de sesquicarbonato de sodio dihidratado en agua y aforado a 1000 ml y afore a 500 ml. Manténgase en refrigeración y prepárese solamente la cantidad necesaria para un día.

4) *Catalizador.* Solución de sulfato de cobre (200 mg de sulfato en 100 ml de agua).

Técnica.

A 5 ml de sustrato amortiguador añada 0.5 ml de muestra, usando una pipeta limpia para cada determinación. Mezcle y caliente en el baño de agua a 40°C e incube a 40°C durante 15 minutos. Añada 2 gotas de catalizador de sulfato de cobre y 6 gotas de reactivo de BQC.

Mezcle y reincube durante 5 minutos. Saque el tubo del baño, añada 3 ml de alcohol butílico y extraiga el azul de indofenol invirtiendo el tubo varias veces. Para la separación del alcohol butílico deje el tubo en reposo durante 2 minutos. Repita la extracción y separación. Deje los tubos en posición vertical por 2 ó 3 minutos para que se separe completamente el alcohol butí

lico. Repita la extracción y separación.

Cualquier indicio de coloración azul indica una pasteurización incorrecta.

Determinación de fosfatasa por el método II A.O. A.C. o método de Sanders y Sager.

Toma de muestra.

Preparación de la muestra.

Equipo necesario.

Tubos de ensayo de 150 X 15 mm. graduados - en 5 y 10 ml.

Tubos de ensayo de 150 X 23 mm.

Pipetas serológicas de 2 ml.

Baño de agua de temperatura regulable.

Vaso de precipitados de 1000 ml.

Vaso de precipitados de 500 ml.

Embudos de vidrio de 8 cm de diámetro.

Papel filtro Whatman 42 ó 248.

Fotocolorímetro con filtro de 610 milimicras.

Reactivos empleados.

a) Amortiguadores.

1) Amortiguador de hidróxido-bario-borato,

pH 10.6 ± 0.15 a 25°C . Disuelva en agua 25 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ fresco, y diluya a 500 ml. Separadamente disuelva 11 g de H_3BO_3 y diluya a 500 ml. Caliente cada solución a 50°C , mézclelas y agite y enfríe a $\pm 20^{\circ}\text{C}$, filtre y conserve el -- filtrado en un lugar fresco y bien tapado. Para usarlo con la leche diluya este amortiguador en proporción de 1:1 con agua destilada.

2) Amortiguador para el desarrollo del color, pH 9.8 ± 0.15 a 25°C . Disuelva 6 g de metaborato de sodio (NaBO_2) y 20 g de NaCl en agua y diluya con agua 1:1.

3) Amortiguador para dilución del color. Diluya 100 ml del amortiguador precedente (2) a 1:1 con agua destilada.

4) Amortiguador a base de bórax, para ajustar el potenciómetro. Solución de bórax 0.01 M, pH 9.18 a 25°C . Disuelva 3.814 de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, en agua y diluya a un litro. La solución deberá secarse a la estufa antes de usarse. Use se la solución después de 10 minutos de haberla sacado de la botella, para evitar cualquier contaminación con CO_2 .

b) Sustratos amortiguadores.

1) Para evaluar la pasterización. Disuelva

0.10 g de fenil fosfato disódico cristalino -- ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4$) exento de fenol, en 100 ml del amortiguador de hidróxido de bario-borato (a-1) ya diluido 1:1. Los cristales de fenil fosfato disódico deben conservarse en desecador. En caso de que esta solución no estuviera exenta de fenol, entonces deberá purificarse de la manera siguiente:

Disuelva 0.5 g en 4.5 ml de agua y añada 0.5 ml del amortiguador (a-1) y 2 gotas de reactivo BQC y deje reposar durante 30 minutos. Extraiga el color con 2.5 ml de alcohol butílico y deje reposar hasta que el alcohol se separe. Quite el alcohol con un gotero y deséchelo. Diluya 1 ml de la solución acuosa a 100 ml con el amortiguador a-1. Esta solución madre puede conservarse en refrigeración por varios días, aunque antes de usarse deberá desarrollarse el color y extraerlo.

2) Para resultados cuantitativos en leche cruda, prepárese igual que el anterior con la excepción de que se usarán 0.20 g de fenil fosfato disódico o 2 ml de la solución purificada.

3) Precipitantes de zinc-cobre para proteínas.

Disuelva 3.0 g de sulfato de zinc ($\text{Zn SO}_4 \cdot$

7 H₂O) y 0.6 g de sulfato de cobre (Cu SO₄•5 H₂O) en agua y diluya a 1 litro con agua destilada.

4) Reactivo BQC (N 2,6, tribromo-p-benquino noimina).

Disuelva 40 mg de BQC en 10 ml de alcohol - absoluto, etílico o metílico y transfíeralos a - un frasco gotero ámbar. Este reactivo puede emplearse hasta un mes después de haberse preparado si se conserva en refrigeración. No se use - si se torna café. La BQC también deberá guardar se en congelación o en desecador.

5) Solución de sulfato de cobre.

Disuelva 0.05 g de sulfato de cobre pentahidrato en agua y diluya a 100 ml.

6) Alcohol butílico normal de punto de ebullición de 116-118°C.

Ajuste el pH mezclando 1 litro de alcohol - con 50 ml del amortiguador a-2. Consérvese en - frasco de tapón esmerilado.

7) Soluciones tipo de fenol.

a) Solución madre o concentrada. Pese exactamente 1000 g de fenol puro y afore con agua - destilada a 1 litro en matraz volumétrico. 1 ml contiene 1 mg de fenol, esta solución permanece estable por meses si está refrigerada (como el -

fenol químicamente puro se hidrata fácilmente, - se debe verificar la concentración de esta solución por valoración).

Con esta solución prepare más soluciones tipo que contengan respectivamente 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 microgramos por ml de fenol.

En forma similar prepare, a partir de la solución madre, soluciones tipo que contengan 20, 30 y 40 microgramos por ml.

Mida cantidades apropiadas de las solucio--nes tipo, en series de tubos (preferiblemente - graduados a 5.0 y 10.0 ml), para obtener respectivamente 0 (testigo) 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 y 40.0 unidades de fenol.

Para aumentar el brillo del color azul y mejorar la estabilidad de las soluciones tipo, -- agregue a cada tubo 1 ml de la solución de sulfato de cobre (5). Después 5 ml del amortiguador α -3 y diluya a 10 ml con agua destilada. Añada 4 gotas (0.08 ml) de la solución de BQC, mezcle y deje desarrollar el color durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lea el color desarrollado con un fotómetro equipado con filtro de 610 milímicras, reste el valor del testigo a cada solu--ción tipo de fenol y prepare la curva.

Técnica.

1) Se miden porciones de 1 ml de leche en 2 ó 3 tubos (un tubo es necesario como testigo y el otro para hacer la determinación por duplicado).

2) Caliente el testigo 1 minuto en baño de agua hirviendo y enfríe a la temperatura ambiente, de este paso en adelante tanto el testigo como las determinaciones, se tratarán de la misma manera.

3) Añada 10.0 ml del sustrato amortiguador b-1 o b-2. Tape el tubo y mezcle. Este sustrato es propio para leche fresca, pero si ésta está ligeramente ácida, debe emplearse el amortiguador a-1 sin diluir.

4) Inmediatamente después de haber añadido el sustrato, incube en baño de agua a 37-38°C durante una hora agitando de vez en cuando.

5) Caliente en el baño de agua hirviendo - por un minuto (la temperatura del contenido del tubo debe ser de 85-90°C). Enfríe a temperatura ambiente, en baño de agua fría.

6) Añada 1 ml de precipitante de Zn-Cu. Si la leche está agria, entonces añada 1 ml de solución al 6% de $Zn SO_4 \cdot 7 H_2O$ en agua. Mezcle.

7) Filtre a través de papel Whatman número 42 o equivalente. Coloque 5 ml del filtrado en un tubo graduado a 5.0 y 10.0 ml.

8) Añada 5 ml del amortiguador para el desarrollo del color.

9) Ponga 4 gotas del reactivo BQC, mezcle y deje para desarrollar el color en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente.

10) Determine la intensidad de color azul, - ya sea con fotómetro o por comparación visual - con las soluciones tipo.

a) Con fotómetro: Usando filtro de 610 milimicras. Lea las intensidades de color del testigo y los tipos. Reste la lectura del testigo de los de las soluciones y convierta los resultados a equivalentes de fenol, por comparación con la curva tipo preparada según g-2. Cuando se usa el fotómetro se puede omitir la extracción con alcohol butílico.

b) Por comparación visual con la solución tipo. En muestras que den más de 5 unidades compare colores con las de las soluciones acuosas tipo, preparadas, según g-2.

11) Cuando se observa durante el desarrollo del color que la prueba va a ser sumamente posi-

tiva (mayor de 20 unidades) y que 4 gotas de BQC no van a ser suficientes para combinarse con todo el fenol, pipetee una alícuota adecuada a -- otro tubo, diluya a 10.0 ml con amortiguador para dilución del color y añada 2 gotas más de BQC. Con cada prueba diluya y trate el testigo de la misma manera. Si todavía la coloración fuera - muy intensa, diluya nuevamente en igual forma - hasta que el color final esté dentro de los límites visuales de las soluciones tipo o de la curva del fotómetro. Después de la última adición del BQC, espere 30 minutos para el desarrollo - del color y entonces haga las lecturas. Para corregir las lecturas por la dilución, multiplique por 2 para la dilución 5 + 5, por 10 para la dilución 1 + 9 y por 50 para la dilución 1 + 9 seguida por la dilución 2 + 8.

12) Cuando se usa 1.0 ml de muestra y se - añaden 11.0 ml de reactivo (volumen total 12 ml, de los cuales se emplean 5 ml del filtrado), multiplique el valor de la lectura por 2.4 para convertir a equivalentes de fenol por ml de muestra.

Equivalentes de fenol mayores de 4.0 microgramos por ml, indican pasterización deficiente, en leche de vaca.

Cuenta estándar (Bacterias mesófilas aerobias)

Introducción

Cuando se pretende investigar el contenido de microorganismos vivos en un alimento, la técnica más comúnmente utilizada es el recuento en placa. Esta técnica se aplica para gran variedad de microorganismos y su fundamento consiste en contar las colonias que desarrollan en el medio de elección, después de cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas regulables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

En realidad, esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus distintas necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hace que el número de colonias contadas constituya una aproximación de la cifra realmente presente. No obstante, la ejecución de la técnica, cuando se siguen fielmente las condiciones que se señalan para su desarrollo, puede llegar a ser lo bastante reproducible para

dar significado a los resultados que se obtengan.

Material y equipo.

- a) Horno para esterilizar a 180°C .
- b) Autoclave con termómetro o manómetro probado con termómetro de máximas.
- c) Baño maría con termostato y termómetro.
- d) Licuadora de una o dos velocidades reguladas por un reóstato, con vasos metálicos es
tériles.
- e) Balanza de capacidad no mayor a 2,500 y de sensibilidad de 0.1 g.
- f) Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.
- g) Utensilios estériles para la preparación de las muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, -
cucharas, espátulas.
- h) Pipetas bacteriológicas estériles de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml, respectivamente.
- i) Frascos de vidrio de boca angosta de 250 -
ml de capacidad con tapón de rosca conte---
niendo 90 ml, o tubos de 16 X 150 mm con ta
pón de rosca conteniendo 9 ml de solución -

reguladora diluyente, en ambos casos + 1% - del volumen señalado después de la esterilización.

- j) Contador de colonias Quebec o equivalente.
- k) Contador manual Tally.
- l) Cajas de Petri estériles de 100 X 15 mm.

Medios de cultivo y reactivos.

- a) Solución reguladora diluyente:

KH_2PO_4 34 g
 Agua destilada .. 500 ml.

Disolver el fosfato en agua destilada y -- ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1N. - Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 121°C. Conservar en refrigeración. Tomar 1.25 ml de solución reguladora y llevar a un litro con agua destilada, Ésta es la solución de trabajo. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml, según se requiera. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

- b) Gelosa-triptona-extracto de levadura:

Extracto de levadura 2.5 g
 Triptona 5.0 g
 Glucosa 1.0 g

Agar 15.0 g.

Agua destilada .. 1,000 ml

Disolver los ingredientes en un litro de -
agua.

Hervir hasta total disolución.

Distribuir en volúmenes de 100 y 200 ml. Es
sterilizar a 1 atmósfera, 1 Kg (15 libras) (121°C)
durante 15 minutos. El pH final del medio debe
ser de 7.0 \pm 0.1 .

Procedimiento.

a) Distribuir las cajas estériles en la me-
sa de trabajo, de manera que su inoculación, la
adición de los medios de cultivo y su rotación,
se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar
las cajas en sus tapas con los datos pertinentes
previamente a su inoculación.

b) Practicar las diluciones decimales que -
se estimen convenientes.

c) Transferir 1 ml de la muestra y de cada
una de las diluciones a cajas de Petri estériles,
evitando todo tipo de contaminación durante la -
maniobra y aplicando la punta de la pipeta al -
fondo de la caja mientras escurre el líquido.

d) Agregar 12 a 15 ml del medio de cultivo
fundido y mantenido a temperatura de 45-48°C en

baño de agua. Mezclarlo con la muestra (6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en el sentido contrario y 6 de atrás a adelante) sobre una superficie lisa y horizontal y cuidando que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. Preparar testigos del medio en cajas sin inóculo.

e) El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no excederá de 20 minutos.

f) Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) durante el tiempo y a la temperatura que se requiera.

g) Seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 30 y 300 colonias, pues es en ellas - donde será menor el error en el recuento.

h) Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de hongos), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de pequeñas partículas de alimento.

i) Con el auxilio de la lente de aumento y de la cuadrícula de contador, contar todas las -

colonias de las placas seleccionadas. Si el número se calcula que es mayor de 300, y no se dispone de placas preparadas con las diluciones subsecuentes, contar en la mitad o en un cuarto representativo de ella, multiplicando por 2 o por 4 el número obtenido. El fondo de una caja de Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros grandes de la cuadrícula del contador.

j) Multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias por mililitro o gramo de la muestra.

k) Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 colonias, utilícese la placa cuyo recuento se aproxime más a esta cifra. Si la placa correspondiente a la primera dilución es la única que presenta colonias y éstas son menos de 10, reportar el número de colonias contadas seguidas de la frase: en la dilución 1:10.

l) Si todas las placas: 1) no muestran colonias, 2) muestran excesiva difusión de las mismas, 3) están contaminadas o no son satisfactorias por cualquier motivo, anótese respectivamente: 1) sin colonias, 2) colonias difusas, 3) inconcluyente por accidente de laboratorio.

m) Redondear la cifra obtenida en el recuento de manera que sólo aparezcan 2 dígitos signi-

cativos al inicio de esa cifra.

n) Reportar: cuenta de bacterias mesófilas aerobias en placas de gelosa-triptona-extracto - de levadura incubadas X horas a 35°C.

Prueba para fosfatasa reactivada y residual.

Reactivo.

Solución de cloruro de magnesio. 0.1196 mg/ml. Disuelva 100 g de $MgCl_2 \cdot 5 H_2O$ en 25 ml de agua, entíbie ligeramente. Transfiera a un frasco de 100 ml, enjuague con agua, enfríe y diluya a 100 ml.

Controles.

Coloque 50 ml de cada muestra por analizar en un baño de agua en ebullición y manténgalo un minuto así después de que la muestra alcanzó -- $95^{\circ}C$. Enfríe y use una porción de cada una para dilución según se requiera y para el blanco hervido.

Determinación.

Coloque 10 ml de alícuota de la muestra en un tubo de tapón de rosca (exento de fenol). Prepare otro tubo idéntico con 10 ml de alícuota y agregue solución de $MgCl_2$ como sigue:

<u>Contenido de grasa de la muestra (%).</u>	<u>Solución de MgCl₂/10 ml de alícuota (ml)</u>
3 - 7	0.40
8 - 12	0.35
13 - 18	0.30
19 - 25	0.25
26 - 31	0.20
32 - 40	0.15

Incube ambas alícuotas durante una hora a -34°C. Retire las muestras del baño y retire un ml de la muestra que contiene Mg y agregue 5 ml del blanco hervido correspondiente. Pruebe actividad de fosfatasa por el método de Sanders-Sa--ger a la muestra sin diluir que no contiene Mg y también a la muestra diluida 1 + 5 que contiene Mg.

Interpretación.

Si la muestra 1 + 5 diluida que contiene Mg tiene una actividad de fosfatasa mayor o igual a la muestra sin diluir que no contiene Mg, se re--porta como negativa para fosfatasa residual e indica que la fosfatasa que se había medido en un principio era reactivada. Si la muestra diluida contiene menos actividad que la muestra sin di--luir, se considera positiva para fosfatasa resi--

dual desde un principio. También pueden obtenerse falsos positivos para fosfatasa residual si - la muestra reactivable se mantiene a elevada temperatura (70-75°F) por 2 horas o más.

ASPECTOS ESTADÍSTICOS

Método de mínimos cuadrados

	X	Y	$X = X - \bar{X}$	$Y = Y - \bar{Y}$	X^2	$X Y$
1)	0.5	0.042	11.05	-0.2068	122.1025	-2.2851
2)	1.0	0.051	10.55	-0.1978	111.3025	-2.0867
3)	2.0	0.070	9.55	-0.1788	91.2025	-1.7075
4)	3.0	0.090	8.55	-0.1588	73.1025	-1.3577
5)	4.0	0.108	7.55	-0.1408	57.0025	-1.0630
6)	5.0	0.126	6.55	-0.1228	42.9025	-0.8043
7)	10.0	0.222	-1.55	-0.0268	2.4025	0.04154
8)	20.0	0.398	-8.45	0.1492	71.4025	-1.2607
9)	30.0	0.570	-18.45	0.3212	340.4025	-5.9261
10)	40.0	0.811	-28.45	0.5622	809.4025	-15.9945
$\Sigma X = 115.5$ $\bar{X} = 11.55$		$\Sigma Y = 2.488$ $\bar{Y} = 0.2488$		$\Sigma X^2 = 1721.225$		$\Sigma XY = -32.485$

La recta de aproximación por mínimos cuadrados del conjunto de puntos $(X_1, Y_1), (X_2, Y_2) \dots (X_n, Y_n)$ tiene la ecuación:

$$Y = a_0 + a_1 X$$

Donde las constantes a_0 y a_1 se determinan mediante el sistema de ecuaciones:

$$\Sigma Y = a_0 N + a_1 \Sigma X$$

$$\Sigma XY = a_0 \Sigma X + a_1 \Sigma X^2$$

Que son las llamadas "ecuaciones normales para la recta de mínimos cuadrados".

Las constantes a_0 y a_1 pueden sacarse de las ecuaciones anteriores y se obtienen las siguientes fórmulas:

$$a_0 = \frac{(\Sigma Y) (\Sigma X^2) - (\Sigma X) (\Sigma XY)}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$a_1 = \frac{N \Sigma XY - (\Sigma X) (\Sigma Y)}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

Sustituyendo en las fórmulas anteriores:

$$a_0 = \frac{(2.488) (1721.225) - (115.5) (-32.4856)}{10 (1721.225) - (115.5)^2}$$

$$a_0 = 2.075$$

$$a_1 = \frac{10 (-32.4856) - (115.5) (2.488)}{10 (1721.225) - (115.5)^2}$$

$$a_1 = 0.1581$$

Sustituyendo en la fórmula: $Y = a_0 + a_1 X$, con lo obtenido anteriormente y resolviendo simultáneas, con un par de puntos obtenidos en los datos queda lo siguiente:

$$X = (0.5) \quad (1.0)$$

$$Y = (0.042) \quad (0.051)$$

Así:

$$0.042 = a_0 + 0.5 a_1$$

$$0.051 = a_0 + 1.0 a_1$$

$$a_0 = - 1.0 a_1 + 0.051$$

$$0.042 = (- 1.0 a_1 + 0.051) + 0.5 a_1$$

$$0.042 = 0.05 a_1 + 0.051$$

$$- 0.051 + 0.042 = - 0.5 a_1$$

$$a_1 = \frac{0.009}{0.5}$$

$$a_1 = 0.018$$

Sustituyendo a_1 :

$$0.051 = a_0 + 1.0 (0.018)$$

$$a_0 = 0.033$$

Método de pares de puntos.Absorbancia.

$$y_1 = 0.042$$

$$y_2 = 0.051$$

$$y_3 = 0.070$$

$$y_4 = 0.090$$

$$y_5 = 0.108$$

$$y_6 = 0.126$$

$$y_7 = 0.222$$

$$y_8 = 0.398$$

$$y_9 = 0.570$$

$$y_{10} = 0.811$$

Soluciones tipo.

$$X_1 = 0.5$$

$$X_2 = 1.0$$

$$X_3 = 2.0$$

$$X_4 = 3.0$$

$$X_5 = 4.0$$

$$X_6 = 5.0$$

$$X_7 = 10.0$$

$$X_8 = 20.0$$

$$X_9 = 30.0$$

$$X_{10} = 40.0$$

$$y_6 - y_1 = 0.126 - 0.042 = 0.084$$

$$y_7 - y_2 = 0.222 - 0.051 = 0.171$$

$$y_8 - y_3 = 0.398 - 0.070 = 0.328$$

$$y_9 - y_4 = 0.570 - 0.090 = 0.480$$

$$y_{10} - y_5 = 0.811 - 0.108 = 0.703$$

$$\bar{D} y = \frac{0.084 + 0.171 + 0.328 + 0.480 + 0.703}{5}$$

5

$$\bar{D} y = 0.3532$$

$$X_6 - X_1 = 5.0 - 0.5 = 4.5$$

$$X_7 - X_2 = 10.0 - 1.0 = 9.0$$

$$X_8 - X_3 = 20.0 - 2.0 = 18.0$$

$$X_9 - X_4 = 30.0 - 3.0 = 27.0$$

$$X_{10} - X_5 = 40.0 - 4.0 = 36.0$$

$$\bar{D} X = \frac{4.5 + 9.0 + 18.0 + 27.0 + 36.0}{5}$$

$$\bar{D} X = 18.9$$

$$m = \frac{\bar{D} Y}{\bar{D} X} = \frac{0.3532}{18.9} = 0.0186$$

$$\bar{X} = \frac{0.50 + 1.0 + 2.0 + 3.0 + 4.0 + 5.0 + 10.0 + 20 + 30 + 40.0}{10}$$

$$\bar{X} = \frac{115}{10} = 11.55$$

$$\bar{Y} = \frac{0.042 + 0.051 + 0.070 + 0.090 + 0.108 + 0.126 + 0.222 + 0.398 + 0.570}{10}$$

$$\underline{0.811}$$

$$\bar{Y} = \frac{2.488}{10} = 2.488$$

De la ecuación de la recta:

$$\bar{Y} = m \bar{X} + c$$

Despejando:

$$C = \bar{Y} - m \bar{X}$$

$$C = 0.2488 - (0.0186) (11.55)$$

$$C = 0.2488 - 0.2148$$

$$C = 0.034$$

Sabiendo ya los valores del centro de gravedad de los datos y de la pendiente, pueden sustituirse en la fórmula de la recta y como se están relacionando los datos de absorbancia contra unidades de fenol, al relacionar con la pendiente - obtenida aquí por estos datos, se llega a obtener directamente las unidades de fenol.

Así:

$$\bar{Y} = m \bar{X} + C$$

Donde:

$$m = 0.0186$$

$$C = 0.034$$

\bar{Y} = Valor de absorbancia.

\bar{X} = Unidades de fenol, desconocidas.

Despejando \bar{X} , queda:

$$\bar{X} = \frac{Y - C}{m}$$

Resultados de la hipótesis 1.

Esta hipótesis sostenía que los descuidos - personales, en diferentes partes del análisis, - provocaban resultados anormales al cuantificar - unidades de fenol.

Al realizar un estudio a fondo en cuanto a la observación estricta en todos los pasos de la marcha del análisis, se pudo comprobar que, en efecto, había varias deficiencias debidas exclusivamente a descuidos personales.

Sin comunicar estas observaciones al analista, se procedió a realizar un duplicado de análisis de las mismas muestras que él hacía, pero cuidando estrictamente todos los pasos de la marcha. Se analizaron 200 muestras en la forma descrita, de las cuales 34 tuvieron diferentes resultados. Se comprobó que de estas 34 muestras, el resultado siempre fue menor en aquellas que se analizaron con cuidado.

Se procedió a obtener el valor esperado, debido a estos errores en el análisis, aplicando la siguiente fórmula:

$$E (X) = p \bar{X}$$

En donde:

$$p = \text{Probabilidad de ocurrencia} = \frac{34}{200} = 0,17$$

\bar{X} = Promedio de las unidades de fenol de las diferencias observadas.

El valor de \bar{X} resultó ser de = 9.98

Por tanto: $E(X) = 0,17 \times 9.98 \approx 1.7$

El resultado de 1.7 se interpreta como las unidades de fenol que deberán aumentarse al valor de la norma norteamericana de 4 unidades de fenol máximas, en el caso de analizar como se ha hecho hasta ahora. Aquí quedan dos alternativas: la primera, seguir analizando igual y poner como norma, habiendo probado sólo la hipótesis 1, un valor de 5.7 unidades de fenol como límite máximo de la prueba, la segunda alternativa es analizar cuidadosamente manteniendo la norma actual de 4 unidades de fenol.

Resultados de la hipótesis 2.

El criterio utilizado para proceder a la -- evaluación de las variables contenidas en el -- planteamiento de la hipótesis 2, consistió en -- realizar los análisis correspondientes del agua con que se enjuagan los tanques, el pasteurizador, las llenadoras, el estado de las gomas de las -- llenadoras y las botellas después del lavado; se seleccionó una planta productora de leche, la -- cual ha sido frecuentemente sancionada debido a que se ha encontrado un resultado alto en cuanto a los valores permitidos en unidades de fenol.

El muestreo se realizó de la siguiente manera:

a) Muestra del agua del enjuague de la llenadora, antes de iniciar el proceso con leche.

b) Muestra del agua de enjuague del tanque de balanceo, antes de iniciar el proceso con leche.

c) Muestra para analizar restos fenólicos - en botellas vacías después de su lavado (seis - muestras).

Los valores de las lecturas de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro en relación a los incisos anteriores, son los siguientes:

<u>Fase</u>	<u>Absorbancia</u>	<u>Testigo</u>	<u>Unidades de fenol</u>
a)	0.075	0.065	0.0
b)	0.055	0.065	0.0
c)			
1)	0.072	0.065	0.0
2)	0.062	0.065	0.0
3)	0.075	0.065	0.0
4)	0.073	0.065	0.0
5)	0.078	0.065	0.0
6)	0.065	0.065	0.0

Dado que los resultados obtenidos, en unidades de fenol, para los tres tipos de muestras de agua de enjuague corresponden a un valor de cero unidades, se concluye que estos aspectos no influyen en el aumento del valor de dichas unidades de fenol.

Resultados de la hipótesis 3.

En base a que el enunciado de la hipótesis 3 contiene dos variables, la primera relacionada con la reactivación de la fosfatasa después de - que la leche permanece a una temperatura elevada durante varias horas, y la segunda relacionada - con pruebas positivas para fosfatasa causadas - por microorganismos, se procedió de la siguiente manera:

a) Se tomó una muestra de leche que de ante mano se tenía la seguridad de que no tenía contaminación por fenol, con el objeto de que, cual-quier cantidad de fosfatasa que hubiera, se de-biera exclusivamente a proliferación bacteriana.

Posteriormente, la muestra fue colocada a - una temperatura constante de 32°C con el objeto de acelerar la proliferación bacteriana, y tomando cada hora una cantidad determinada de la mis-ma para efectuarle las pruebas de fosfatasa, sembrando en placa para cuenta estándar, para obser-var la dependencia de ambas variables. Se reali-zó este procedimiento durante siete horas conti-nuas. Se realizaron diez pruebas y se muestran los promedios obtenidos en la tabla siguiente:

<u>Tiempo en horas</u>	<u>Absorbancia</u>	<u>Testigo</u>	<u>Unidades de fenol</u>	<u>Cuenta Estándar</u>
0	0.186	0.194	0	80,000
1	0.173	0.194	0	100,000
2	0.209	0.194	0	180,000
3	0.200	0.194	0	300,000
4	0.235	0.194	0	560,000
5	0.193	0.194	0	1,100,000
6	0.180	0.194	0	1,950,000
7	0.186	0.194	0	3,500,000

De los resultados anteriores, se concluye - que la proliferación bacteriana no puede ser considerada como factor que influya grandemente en las unidades de fenol que se deban reglamentar. Esto, debido a que se llegó a una cuenta bacte--riana lo suficientemente alta a niveles prácti--cos como para que se hubiera producido fosfatasa microbiana; es decir, se ha observado en la práctica diaria que una leche, aunque sea de ínfima categoría, nunca sobrepasa los cuatro millones - de bacterias en cuenta estándar. Esto indica - que se llegó a este valor y no se obtuvo presen--cia de fosfatasa, la probabilidad de ocurrencia de este hecho (aparición de fosfatasa microbia--na), es muy baja y de hecho no debe influir este fenómeno en la norma por establecer.

b) Reactivación de la fosfatasa.

Aquí se pretendió estudiar la incidencia del fenómeno de reactivación, para lo cual se practicó la prueba de reactivación a 50 muestras que habían presentado inicialmente una cuenta elevada de unidades de fenol. Ninguna de las muestras analizadas para reactivación presentó reacción positiva a esta prueba. De aquí se puede concluir que este fenómeno no debe influenciar significativamente la norma actual de esta prueba. Es sabido que este fenómeno se presenta en leches pasteurizadas con corto tiempo de exposición a alta temperatura o en leches cuyo tiempo de exposición es adecuado, pero la temperatura de pasteurización es la mínima. Lo único que se puede decir es que este fenómeno es muy poco frecuente.

Resultados de la hipótesis 4.

Considerando que los resultados obtenidos durante la primera visita a la planta productora de leche indicaron que la elevada cantidad de unidades de fenol no estaba relacionada con el agua de enjuague, fue necesaria una segunda visita cuyo objetivo fue el de muestrear leche en diferentes etapas del proceso, para determinar cuál de estas influye en la contaminación del producto.

Las fases del procedimiento de toma de muestras se realizaron en el siguiente orden:

a) Leche pasteurizada a la salida de la válvula desviadora de flujo, a una temperatura de 73.5°C .

b) Leche fría antes de entrar a la llenadora.

c) Leche de la zona de regeneración.

d) Leche pasteurizada a la salida de la válvula desviadora de flujo, a una temperatura de 76°C .

e) Leche pasteurizada de la salida de la válvula desviadora de flujo, a una temperatura de 78°C .

f) Leche pasteurizada a la salida de la válvula

vula desviadora de flujo, a una temperatura de -80°C .

Los valores obtenidos para las diferentes fases, se muestran en la tabla siguiente:

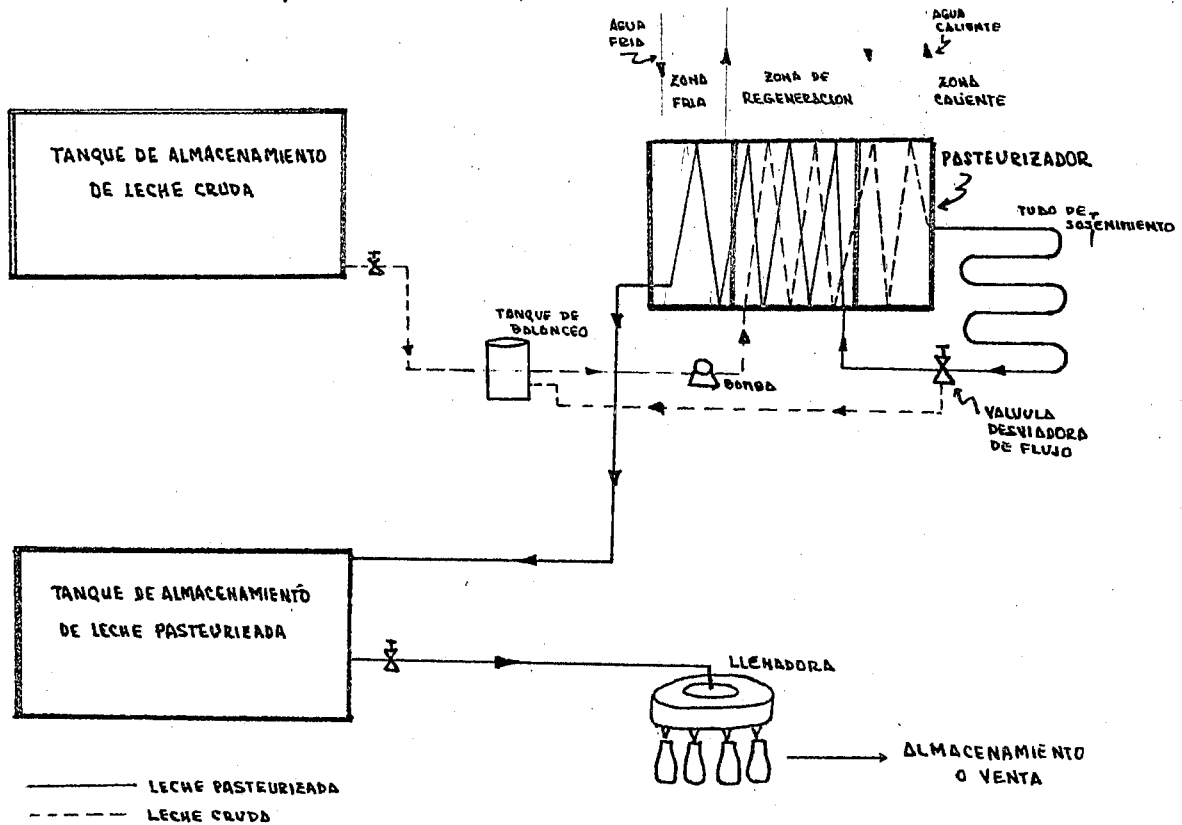
<u>Fase</u>	<u>Absorbancia</u>	<u>Testigo</u>	<u>Unidades de fenol</u>
a)	0.208	0.181	0
b)	1.562	0.181	72.41
c)	1.703	0.181	80.00
d)	0.366	0.181	8.11
e)	0.247	0.181	1.72
f)	0.230	0.181	0.80

De estos resultados se desprende que en la fase a) la leche ha sido bien pasterizada, puesto que se obtuvo un valor de cero unidades de fenol.

En las fases b) y c) se observa un incremento de unidades de fenol debido probablemente a picaduras en alguna de las placas del pasterizador, por lo que se observa que en las fases d), e) y f), disminuyen notablemente dichas unidades al elevar la temperatura, sin que se logre un valor igual a cero, debido posiblemente al paso de pequeñas cantidades de leche cruda en leche pasterizada. Así, se llega a la conclusión de que

el asunto se restringe a un reacondicionamiento del equipo para que su funcionamiento sea el adecuado.

FLUJO DE LA LECHE AL SER PROCESADA



CONCLUSIONES

Después de haber probado cada una de las hipótesis y observado los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

1) En base a las hipótesis 1 y 2, se puede decir que la incidencia de los fenómenos estudiados es bajísima.

2) Se concluye que la norma americana de 4 unidades de fenol es correcta, ya que seguramente este valor incluye la incidencia aleatoria de los fenómenos estudiados.

3) Todas las plantas que presentan resultados anormales en la prueba de la fosfatasa, es porque existe un funcionamiento deficiente del pasterizador, y la única solución es una reparación adecuada del equipo.

4) En base al estudio realizado, lo más que podría subir el límite para actividad de fosfatasa en México, es a 5.7 unidades de fenol.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alais, Charles.
Ciencia de la Leche.
Principios de Técnica Lechera.
Primera Edición en Español de la Segunda Edición Francesa.
Ed. Compañía Editorial Continental, S.A.
1980. México, D.F.
- 2) Asociación Americana de Salud Pública.
Normas para el Examen de los Productos - Lácteos.
Métodos microbiológicos y químicos.
Undécima Edición. Ed. Organización Panamericana de la Salud.
Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 1960. Washington, E.U.A.
- 3) Association of Official Analytical Chemists.
A.O.A.C. Official Methods of Analysis.
Twelfth Edition. Ed. Boarr-William Horwitz Chairman and.
Editor. 1975. Washington, E.U.A.
- 4) Bunge, Mario.
La Investigación Científica.
4a. Edición. Ed. Ariel. 1975. México, D.F.

- 5) Frazier W.C.
Microbiología de los Alimentos.
2a. Edición. Ed. Acribia.
Zaragoza. España, 1976.
- 6) Milk Pasteurization Controls and Tests.
Course Manual.
U.S. Department of Health, Education,
and Welfare.
Cincinnati, Ohio, E.U.A. 1973.
- 7) Ramos Córdova, M.
La Leche, su Producción Higiénica y su -
Control Sanitario.
México, D.F. 1969.
- 8) Russell L. Ackoff.
Scientific Method. Optimizing Applied
Research Decision.
Ed. John Wiley L. Sons, Inc. 1974.
New York.
- 9) Técnicas Generales para Análisis Microbiológico de Alimentos.
Secretaría de Salubridad y Asistencia. -
Dirección General de Laboratorios de Salud Pública.
México, 1979.

10) Woods A.J.

Estadística.

*Unidad Profesional Interdisciplinaria de
Ingeniería y Ciencias Sociales y Adminis_
trativas.*

Sección de Investigación.

I.P.N. 1976. México, D.F.