

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Estudio Comparativo de la Prueba Cualitativa con la
Cuantitativa de Sanders y Sager
(Método II del A.O.A.C.)**

**Para la Determinación de la Fosfatasa como Indicadora de
la Pasteurización en Quesos Decomisados en el
Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México
(CIENT PRUEBAS)**

TESIS PROFESIONAL

1977

Daniel Díaz Urquijo

7749



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A MIS PADRES:

**Everardo Díaz Vargas y
Elsa Urquijo de Díaz,
con gratitud y cariño.**

MI AGRADECIMIENTO:

**A la Empresa Ganaderos Productores de Leche Pura, S.A.
en especial a los Ingenieros del Departamento de Control
de Calidad.**

A mi hermana, Elsa Díaz Urquijo.

**A mis asesores, M.V.Z. Felipe Villanueva Zavala y
M.V.Z. Gustavo Abascal Torres**

**A todas aquellas personas que gentilmente me ayudaron,
Muchas gracias.**

I N D I C E

Introducción.	1
Proceso en General para la Fabricación de Quesos	4
Variedades y Tipos de Quesos	5
Pasteurización de Leches empleadas en la Producción de Quesos.	10
Material y Métodos.	11
Prueba de la Fosfatasa por el Método Colorimétrico Pasterindex	11
Determinación de Fosfatasa por el Método II de la A.O.A.C. o Método de Sanders y Sager	14
Tabla I.	23
Principios de Espectrofotometría	26
Espectroscopia Ultravioleta.	27
Modo de Empleo del Espectrofotómetro o Fotocolorímetro.	29
Curva Tipo	32
Resultados.	33
Comentarios a los Resultados	42
Discusión	43
Conclusiones.	49
Bibliografía.	50

INTRODUCCION

La fosfatasa es una enzima normalmente presente en la leche cruda. En las condiciones ordinarias de pasteurización (lenta, rápida ó ultra rápida), la enzima se inactiva. Se ha demostrado que esta enzima es más difícil de destruir que la mayoría de los organismos patogénicos termo-resistentes que pudieran estar presentes en la leche. La prueba es de gran utilidad para decidir si la leche ha sido pasteurizada, si la leche pasteurizada se ha mezclado con leche cruda, ó incluso si la pasteurización ha sido deficiente.

Las enzimas ó fermentos son catalizadores orgánicos que se forman en las células y su función consiste en activar una reacción química específica. La mayor parte de ellas son termolábiles, es decir, se destruyen ó descomponen por las altas temperaturas.

En la leche se encuentran presentes muchas enzimas, de las cuales sólo algunas tienen importancia práctica, tales como la fósfatasa, lipasa y catalasa.

La fosfatasa es, sin duda alguna, la enzima que más aplicación práctica tiene. Su papel en la leche consiste en acelerar la descomposición de los ésteres del ácido fosfórico liberando fosfatos inorgánicos y alcohol. Existen en la leche dos tipos de fosfatasa: la ácida y la alcalina; ya que esta última es mucho más abundante que la primera, cuando en lactología se habla de fosfatasa, este término se refiere exclusivamente a la fosfatasa alcalina, la cual es una fosfomonoesterasa tipo A, que tiene su actividad óptima a un pH 9-10, y que por lo tanto en la leche pH 6.5-6.7 está actuando en el lado ácido fuera de su óptimo. Debe apuntarse que aunque está invariablemente presente en la leche de vaca, no tiene función específica en la propia leche, y tal vez tiene acceso a ella por la glándula mamaria.

La concentración de fosfatasa varía de un modo regular en la leche, a través del período de lactancia, siendo su mínimo a los 15-25 primeros días después del parto, aumentando después constantemente; también cambia con otros factores tales como la raza del ganado, mamitis, etc. En general se acepta que la cantidad de la enzima en leches crudas mezcladas, medida en relación a la cantidad de Fenol liberada del sustrato amortiguador (buffer) oscila entre 1900 y 2500 microgramos de Fenol por ml de leche. (18)

Los lineamientos de pasteurización moderna se deben a Pasteur, quien en 1864 aplicó un ligero tratamiento de calor a los vinos, para destruir las bacterias responsables de la descomposición ácida ó amarga. Cuando en 1890, Theobald Smith demostró en Texas que el Mycobacterium tuberculosis se moría al someterlo durante 20' a temperatura de 60°C, y cuando también se demostró que de todas las bacterias patógenas comunes que tienen acceso a la leche, el Mycobacterium t. era la más resistente al calor, entonces se establecieron las bases de la actual pasteurización, que puede ser lenta, en la cual la leche se calienta a 61.7°C durante 30', rápida, en la que la temperatura a la que debe someterse la leche es de 71.7°C en un lapso mínimo de 15 segundos y ultra rápida, en la cual el proceso es un poco más complicado, pero en términos generales, la leche debe calentarse a 115°C durante 2 segundos.

La preservación de la leche por calentamiento no es una práctica reciente; ya siglos atrás se participaba de sus efectos benéficos en el Oriente y Oriente Medio. Es así como los cronistas de Marco Polo citan el hecho de que los soldados secaban la leche colándola sobre piedras calientes de donde después la raspaban y así podían transportarla a grandes distancias, rehidratándola cuando deseaban consumirla. (18)

En México, durante los últimos años a través de los distintos puertos y fronteras, se han venido importando diversos productos de origen animal; entre ellos los derivados lácteos en sus diferentes preparaciones.

La consideración de posibles portadores de enfermedades exóticas, en especial de la Fiebre Aftosa, hace necesario reevaluar los actuales criterios que determinan la entrada ó no de estos productos al país.

La prueba para la determinación de la fosfatasa como indicadora de la pasteurización en quesos, que actualmente se realiza en la Aduana del Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México, es de carácter cualitativo, por lo que en muchas ocasiones se obtienen resultados dudosos; por esta razón ha existido la preocupación por contar con un método seguro y eficaz en ese tipo de determinaciones. Cabe mencionar que hasta la fecha se ha permitido la entrada al país de aproximadamente 200 marcas de quesos que han aprobado dicho análisis y como vamos a ver, la gran mayoría de estos quesos proviene de leche mal pasteurizada ó sin pasteurizar, (25) además de la elevada exportación de queso por ciertos países, en especial Francia que produce aproximadamente un millón de toneladas al año, exporta 160 mil toneladas a diferentes países, es el país con mayor consumo de queso por habitante (15 Kg al año), y tiene 220 variedades, más que cualquier otra nación.

Considerando que las últimas investigaciones sobre la inactivación por calor del virus de la Fiebre Aftosa que se encuentra presente en las vacas infectadas por dicha enfermedad, realizadas por Nikitin y Vladimirov del Instituto de Investigación de la Fiebre Aftosa de la URSS, así como Hyde, Blackwell y Callis del Centro de Investigaciones de Plume Island, N.Y., y algunos de estos estudios registrados en el Reporte No. 802 del 14 de marzo de 1975, expuestos en la Oficina Internacional de Epizotias de Paris, Francia, las conclusiones de ellas han llegado a demostrar que es posible recuperar virus de productos ya procesados de leche de animales enfermos (15, 11, 12, 2), y que por la Aduana del Aeropuerto y por las diversas aduanas postales, se importan cantidades regulares de quesos, 173,000 Kg aproximadamente, a partir del año de 1971 a septiembre de 1976. Por lo anterior, existe el interés en desarrollar una

prueba con la cual se determine con exactitud si los quesos procedentes del extranjero vienen bien pasteurizados, por lo que se seleccionó la prueba cuantitativa de Sanders y Sager, (18, 22, 2), con la cual se determinó la enzima fosfatasa por medio de la cuantificación en microgramos de Fenol por g de muestra, ya que nos puede demostrar fallas en el proceso de pasteurización, ó la presencia hasta de 0.1% de leche cruda en leche pasteurizada.

Es importante conocer el proceso de elaboración de los quesos , ya que existen numerosos tipos y marcas, de ahí que varíen en su sabor, textura, y grado de maduración: suaves, picantes, untuosos, duros, secos, frescos, cremosos y tiernos, succulentos y añejos, por lo que hablaremos primero del proceso en general para su fabricación y después mencionaremos los distintos tipos y variedades de quesos a analizar.

PROCESO EN GENERAL PARA LA FABRICACION DE QUESOS (3)

El queso es leche cuajada y colada, y a veces fermentada. Las primeras dos etapas de elaboración son las mismas para todos los tipos: la coagulación para la cual se emplea el cuajo de un becerro recién sacrificado, que es una diastasa, que convierte en grumos la caseína; y el colado (con ó sin prensadura), por medio del cual se quita el suero al requesón. Salvo los quesos frescos, como el "fromage blanc" ó blando, todos pasan por la tercera etapa: el añejamiento ó maduración, durante la cual se guardan en lugares frescos y húmedos, y se voltean y airean para mejorar la consistencia de la masa.

Cada operación puede requerir diferentes procedimientos. Por ejemplo, una masa semidura como la del Saint-Paulin se logra diluyendo los grumos, ya sin el suero, con agua fresca que después se cuele. Los quesos veteados se obtienen espolvoreando la masa con moho de migas de pan viejo, lo que da esas jaspeaduras verdiazuladas, características del Roquefort. En el caso de algunos quesos cocidos, como el Emmental ó el Comte, se vuelve a poner el requesón con su suero y se calienta

hasta los 52°C. Al irse evaporando el líquido, la masa se solidifica.

También existen diferencias en el añejamiento. El Camembert se madura en 20 días más ó menos; un queso veteadado necesitará de tres a cuatro meses, según su tamaño; el duro suele tardar de tres meses a un año y requiere temperatura y humedad controladas.

El sabor del queso depende, ante todo, de la leche de que está hecho. Esta varía a su vez según la raza del ganado, la hierba con que se le alimenta, el clima y la estación, y hasta la composición del suelo. Así, las cualidades distintivas del Vacherin del Mont-d'Or resultan de los pastizales helados en que pacen las vacas. Y sólo la grama de abril de la Camarga dota al Tome de Arles (de leche de oveja) de sus características singulares. Asimismo, influyen las incontables innovaciones de cada aldea al pasar de los siglos.

VARIEDADES Y TIPOS DE QUESOS (1)

- I. Quesos Naturales
 - a) Frescos y Blandos
 - Bajo contenido de grasa.
 - Alto contenido de grasa.
 - b) Madurados
 - 1. Duros
 - 2. Semiduros
 - 3. Blandos ó suaves
- II. Quesos Elaborados (Cocidos - quesos para untar)
- III. Quesos de Suero (Poco conocidos en México)

a) Quesos Frescos y Blandos.-

Los quesos de leche agria reciben el nombre genérico de numerosos tipos, ya que en estos la cuajada está formada exclusivamente por ácido láctico produciendo bacterias, pero los quesos frescos que están elaborados con pequeñas cantidades de cuajo, son incluso clasificados como quesos de leche agria.

Los quesos frescos se caracterizan por un bajo pH, 4.5 y un alto contenido en agua, aproximadamente 80%, que es lo que origina a este tipo de quesos y su consistencia pastosa. Debido a esto, no se pueden madurar ni conservar, por lo que es necesario refrigerarlos.

Como grupos representativos de quesos frescos tenemos los siguientes:

- Línea Quarg
- Queso Cottage
- Queso Gervais
- Especialidades regionales
(Pueden incluir en su preparación verduras, frutas, semillas, etc.)

b) Quesos Madurados.-

1. Quesos Duros.-

Los quesos duros son caracterizados por un pH entre 5.0 y 5.6 en quesos frescos, aproximadamente de una semana de elaborados y con un contenido de agua variable entre 55 y 60% en el componente sin grasa del queso maduro, correspondiendo a un contenido total de agua de 30 a 45%. Esta variación de la humedad se debe a las diferentes técnicas de manufacturación. La consistencia flexible ó dura depende del contenido de agua en mayor ó menor cantidad en el queso.

La madurez en los quesos duros se debe al desdoblamiento enzimático durante la formación del cuajo.

Los quesos duros pueden clasificarse de acuerdo a la temperatura de precalentamiento en: alto precalentamiento, 50-55°C, p.e. Emmental; moderado precalentamiento, 34-42°C, p.e. Gouda.

Además de la temperatura de precalentamiento y dependiendo del resto de la técnica de manufacturación, se pueden clasificar los diferentes tipos de quesos de acuerdo a su textura base, en tres grupos:

- Quesos de Ojo Redondo:
 - Línea Emmental y Gruyere
 - Línea Gouda
 - Línea Edam

- Quesos de Textura Granular:
 - Línea Svecia
 - Línea Tilsitt - tipo semiduro

- Quesos de Textura Cerrada:
 - Línea Cheddar
 - Línea Saint Paulín - tipo semiduro

En general podemos considerar dentro de este grupo de quesos duros cocidos y prensados, analizados en este estudio, los siguientes tipos de diferentes países:

- Gruyere (Suiza)
- Manchego (España)
- Roncal (España)
- Port Salut (Suiza)
- Emmental (Suiza)
- Parmesano (Italia)

- Provolone (Italia)
- Cheddar (U.S.A.)
- Chester (U.S.A.)
- Tilsitt (Alemania)
- Hergardsost (Suecia)
- Gouda ó Bola (Holanda)

2. Quesos Semiduros.-

Los quesos semiduros son caracterizados por un pH entre 4.7 y 5.1 en quesos frescos de aproximadamente una semana de elaborados y con un contenido de humedad entre 60 y 65% en el componente sin grasa del queso maduro, correspondiendo a un contenido total de humedad de un 45%. La consistencia de estos quesos es generalmente muy flexible, debido al alto contenido de agua.

Los quesos semiduros son generalmente clasificados de acuerdo a su manera de elaborarlos: quesos untables, p.e. Línea Tilsitt y Línea Saint Paulin; quesos con hongos, p.e. Línea de quesos azules, considerando dentro de esta línea al Roquefort (Francia), Cabrales (España), Gorgonzola (España).

Generalmente no se hace una clasificación más extensa sobre la textura.

El proceso de maduración difiere en los quesos untables de los quesos con hongos. En quesos de untar, el proceso de maduración sucede no solamente con la ayuda de enzimas de cuajo y enzimas de cultivo inicial, sino también con enzimas y bacterias de la superficie de quesos untables. El proceso de maduración en el queso azul se debe principalmente a las enzimas que produce el hongo que se agrega a la cuajada.

3. Quesos Blandos ó Suaves.-

Los quesos blandos se caracterizan por un pH entre

4.5 y 4.7 en quesos frescos aproximadamente de una semana de elaborados y con un contenido de agua de un 80% en el componente sin grasa del queso maduro, correspondiendo a un contenido total de humedad de un 50%. Debido a su alto contenido de agua, los quesos suaves tienen un corto período de almacenamiento. Su consistencia varía de suave a semiliquida.

Muchos de los quesos suaves son blancos enmohecidos. Existen tres diferentes procesos de maduración para los quesos blancos enmohecidos:

- Utilizando cuajo y enzimas de bacterias iniciadoras.
- Utilizando enzimas de la superficie enmohecida.
- Utilizando la embarradura de enzimas de bacterias fre cuentemente presentes.

Es normal no hacer una clasificación adicional de acuerdo a la textura. Los quesos blandos por lo general tienen una textura cerrada.

Los quesos de las líneas Camembert y el Brie, son los quesos representativos de los quesos blandos y suaves. Se consideran también como quesos blandos mohosos las siguientes marcas de diferentes países:

- Romatour (Suiza)
- Camembert (Francia)
- Limburgo (Bélgica)
- Brie (Bélgica)
- Schabzieger (Suiza)

PASTEURIZACION DE LECHE EMPLEADAS EN LA PRODUCCION DE QUESOS.- (25)

La mayoría de los higienistas aconsejan la pasteurización por los métodos habituales para las leches empleadas en la elaboración del queso. Sin embargo, algunos industriales no son partidarios de dichas técnicas, debido a que algunas especialidades como el Emmental, Gruyere y Roquefort, no ofrecen las características de los fabricados con leche fresca.

El queso fabricado con leche pasteurizada, puede ser más uniforme en cuanto a sus características, que el preparado con la fresca, pero en cambio, con frecuencia, su sabor suele resultar menos típico que el fabricado con esta última.

Muchos tipos de quesos, entre ellos los quesos frescos, los de pasta dura, Holandeses y Port Salut, así como el Bel Paese, los quesos blandos franceses, Camembert, Brie, los azules Roquefort y los suizos duros como Emmental y Gruyere, se siguen elaborando en la actualidad con leche fresca, si bien existen técnicas para fabricarlos con leches pasteurizadas.

Al hablar de técnicas de pasteurización en quesos, es con objeto de considerar a dichos productos como posibles portadores de enfermedades que ataquen a los animales y al hombre, pues está plenamente comprobado que muchas enfermedades pueden ser transmitidas a través de estos productos.

Los higienistas y los industriales parecen diferir en conceptos en cuanto se refiere a procesos; los primeros aseguran que trabajar con leches pasteurizadas evita la presencia de gérmenes que operan reacciones incontrolables de acidez, oxidación, etc., y los segundos objetan que las leches pasteurizadas no pueden dar los resultados de sabor, olor, textura y consistencia que daría una leche fresca.

MATERIAL Y METODOS

Se muestrearon cien quesos de diferentes marcas provenientes de Europa y América del Sur. En primer lugar se realizó una prueba rápida colorimétrica por medio del reactivo para la prueba de la fosfatasa, Pasterindex, y en segundo lugar, la prueba cuantitativa de Sanders y Sager.

PRUEBA DE LA FOSFATASA POR EL METODO COLORIMETRICO PASTERINDEX (*)

Este método se basa en la teoría de la prueba original de Kay y Graham (1933), en la cual se establece lo siguiente: En la leche existe fosfatasa normalmente. Esta enzima es destruída por las temperaturas de pasteurización, siempre y cuando éstas sean sostenidas por el tiempo correcto. La prueba consiste en hacer actuar la enzima sobre un sustrato amortiguador (buffer) compuesto de fenilfosfato disódico y dietilbarbiturato de sodio. Cuando la leche es cruda, ó no ha sido bien pasteurizada, queda algo de fosfatasa, la que al actuar sobre el éster fenilfosfórico libera fenol simple y la cantidad obtenida, que se determina por el método colorimétrico, es la medida aproximada de fosfatasa en la leche. En este caso que hay liberación de fenol, al actuar sobre la enzima bromoquinona-cloroimida (C.Q.C.), da un color azul, y se valora en unidades azul Lovibond. En caso de no haber fosfatasa presente, por haberse hecho una buena pasteurización, no se advierte el tono azul. (18)

El Pasterindex consta de tres reactivos:

- Pasterindex A.- Es una cápsula que contiene la sal de sodio fenilfosfato.
- Pasterindex B.- Es una cápsula que contiene una sustancia alcalina exactamente medida. Este sustrato, separado de la sal, ha mejorado las cualidades de los reactivos.

(*) Reactivo para la determinación de la fosfatasa.-

Laboratorios Roal, México, D.F.

Pesterindex C.- Es un reactivo fenólico altamente sensitivo en una sustancia protectora inherente, donde además encontramos la enzima bromoquinona-cloroimida (C.Q.C.), que puede ser medida por una cucharita.

MODO DE EMPLEO:

1. Llénese un tubo con agua tibia (37-39°C) y de preferencia destilada, hasta la marca inferior (10 ml)
2. Agréguese el contenido de una cápsula de Pasterindex A y el de una cápsula de Pasterindex B, sin tocar el polvo con los dedos.
3. Agítese a disolución sosteniendo el tubo entre el pulgar e índice de la mano izquierda y golpeándolo ligeramente en su base con el índice de la mano derecha.
4. Agréguese 1 ml de leche por investigar, lo cual coincide con la marca superior, y agítese de nuevo.
5. Procédase en forma análoga con el otro tubo pero empleando una muestra de la leche previamente calentada a 85°C (Tubo testigo).
6. Incúbense ambos tubos en baño maría ó estufa a 37°C durante una hora para determinaciones muy exactas ó durante diez minutos para determinaciones aproximadas. Puede inclusive realizarse la incubación a mano. (*)
7. Hecha la incubación agréguese a cada tubo el contenido de una cucharadita de Pasterindex C.
8. Repósesese diez minutos.
9. Agítese y trás de tres a cinco minutos, compárense los colores con la escala anexa. (Figura 1)

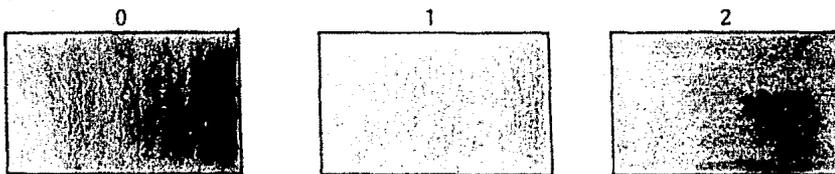
Para cremas y sueros puede emplearse el mismo procedimiento.

(*) En este estudio se realizaron incubaciones de 30 a 45 minutos y la mayoría de una hora en baño maría.

FIGURA No. 1

ESCALA DE COLORES DEL METODO PASTERINDEX

Escala de Colores:



Bien Pasterizado:

Medianamente
Pasterizado:

Mal Pasterizado:

Puede haber ligera variación en el color.

Para mantequilla es necesario fundir una muestra en un tubo de centrifuga en baño maría, centrifugar y utilizar el sobrenadante acuoso para efectuar las pruebas en forma análoga a la leche.

PRECAUCIONES:

Emplear material perfectamente limpio, pipetas diferentes para cada muestra y evitar contaminaciones con sudor, ó saliva así como con plásticos, hule y material fenólico. Manténganse los envases en lugar fresco, seco, al abrigo de la luz y en condiciones de limpieza adecuadas a las advertencias antes mencionadas.

Una vez realizado el método Pasterindex se analizó la misma muestra por medio de la prueba cuantitativa de Sanders y Sager, ó Método Oficial II del A.O.A.C. (American Organization of Agriculture and Chemis tries).

Debe mencionarse que existen muchos métodos para la determinación cuantitativa de la fosfatasa, tales como el de Kay y Graham (1933), el de Aschaffenburg-Mullen, los de la ciudad de Nueva York, el de Scharer, los I y II de la A.O.A.C., etc.; sin embargo, se utilizó éste último por ser el más exacto.

DETERMINACION DE FOSFATASA POR EL METODO II DE LA A.O.A.C. O METODO DE SANDERS Y SAGER (18, 22, 2)

Toma de muestra:- Tener precaución de no contaminar la muestra con fosfatasa ó fenol, para lo cual es indispensable que el equipo que entre en contacto con el queso (pipetas, frascos, matraces, tapones de hule, etc.), sea limpiado con jabones ó detergentes libres de fenol, y cuidadosamente enjuagados con agua destilada. Además es conveniente tenerlos sumergidos en agua

a 82°C, por lo menos durante diez minutos antes de efectuar la prueba. Evítese el uso de tapones de plástico, porque es muy frecuente que éstos estén manufacturados con derivados fenólicos. Si se va a practicar la prueba de la fosfatasa, el único preservativo admisible será el cloroformo en proporción de 1 a 3%, y los recipientes deberán estar provistos de tapones de hule rojo, libres de fenol.

FUNDAMENTO DEL METODO

La muestra de leche se incuba con fenilfosfato en solución reguladora de hidróxido de bario. Si la fosfatasa activa está presente, el fenilfosfato se hidroliza y se forma fenol.



En la leche que ha sido pasteurizada eficientemente, la fosfatasa se destruye y no hay hidrólisis. El fenol formado se determina colorimétricamente haciéndolo reaccionar con 2,6 - Dibromoquinonacloroimida - (C.Q.C.) obteniéndose un color azul, cuya densidad se mide al espectrofotómetro.

EQUIPO NECESARIO

Tubos de Ensayo de 150 x 15 mm, graduados a 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 1,000 ml.

Vaso de precipitados de 500 ml.

Embudos de vidrio de 8 cm de diámetro.

Papel filtro Whatman 42 ó 248

Fotómetro con filtro de 610 milimicras.

REACTIVOS EMPLEADOS

a) Amortiguadores:

1. Amortiguadores de hidróxido de bario borato, de los tipos 25-11, 26-11, 27-11, 28-11 y 29-11.

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

Para preparar los amortiguadores de hidróxido de bario-borato 26-11, 27-11, 28-11 y 29-11 necesarios para las determinaciones de derivados de quesos, hágalos exactamente igual que el 25-11 excepto que usando 26, 27, 28 y 29g respectivamente de hidróxido de bario, en vez de los 25 que se usan para el primero y no se deberán diluir 1:1.

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 a 1 litro.

3. Amortiguador para la dilución del color. Diluya 100 ml del amortiguador precedente a un litro con agua destilada.

4. Amortiguador tipo de borax, para ajustar el potencial. Solución de borax 0.01 M pH 9.18 a 25°C .

Disuelva 3.814 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (muestra del Nat. Bureau of Standards) en agua, y diluya a 1 litro. La sal deberá secarse en estufa antes de usarse. Usese la solución después de diez minutos de haberla sacado de la botella, para evitar cualquier contaminación con CO_2 .

b) Sustratos Amortiguadores:

1. Para valuar la pasteurización. Disuelva 0.10 g de fenil fosfato disódico cristalino ($\text{Na}_2\text{C}_8\text{H}_5\text{PO}_4$) libre de fenol,

en 100 ml de amortiguador de hidróxido-bario-borato a)1., ya diluido 1:1. Los cristales de fenil-fosfato-disódico deben conservarse en desecador. En caso de que esta sal no fuera libre 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 CQC d), y deje reposar por espacio de 30 minutos. Extraiga el color con 2.5 ml de alcohol butílico f) 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 refrigerada durante varios días, aunque antes de usarse deberá desarrollar el color y reextraerlo.

2. Para resultados cuantitativos en leche cruda, prepárese igual que el anterior, pero se usarán 0.20 g de $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4$ ó 2.0 ml de la solución purificada.

c) Precipitante para proteínas de zinc-cobre:

Disuelva 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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua y diluya 100 ml con agua destilada.

d) Reactivo CQC (N, 2, 6,-tricoloro-p-benzoquinoneimina):

Disuelva 40 mg de CQC en 10 ml de alcohol absoluto etílico ó metílico y transfíeralos a un frasco gotero ámbar. Este reactivo puede emplearse hasta un mes después de haberlo preparado si se conserva en refrigeración; no se use si se torna café. El CQC también deberá guardarse en congelación ó en desecador.

e) Solución de sulfato de cobre:

Disuelva 0.05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua y diluya a 100 ml.

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

Ajuste el pH mezclando un litro de alcohol con 50 ml de amortiguador a)1.2. Consérvese en frasco de tapón esmerilado.

g) Patrones de fenol:

1. Solución Madre.-

Pesar exactamente 1.0 g de fenol puro; transferir a un matraz volumétrico de 1 litro y diluir hasta la marca con agua mezclando perfectamente (cada ml contiene 1 mg de fenol). Esta solución mantenida en el refrigerador es estable durante varios meses.

2. Soluciones patrón de comparación.-

Diluir 10 ml de la solución madre (g.1) a un litro con agua y mezclar (1 ml contiene 10 microgramos, 0.00001 g). Para preparar patrones más diluidos, diluir 5, 10, 30 y 50 ml en 100 ml para que contengan respectivamente 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 microgramos ó unidades de fenol por mililitro. Estas soluciones patrón mantenidas en el refrigerador no se deben emplear después de una semana.

De manera semejante preparar las soluciones patrón que contengan 20, 30 y 40 unidades por mililitro.

Para preparar la escala de colores proceder en la siguiente forma: En series de tubos (de preferencia graduados en 5 y 10 ml), medir volúmenes adecuados de las soluciones patrón, a fin de obtener un margen favorable de patrones según las necesidades. Incluir 0.0 (testigo)0.5, 1.0, 3.0, 10.0, 20.0, 30.0 y 40.0 unidades. Con objeto de aumentar la intensidad del color azul y la estabilidad de los patrones agregar a cada tubo 1 ml de la solución de sulfato de cobre e), al 0.05%

y a continuación 5 ml de la solución reguladora para dilución del color, diluyendo el contenido de cada tubo a 10 ml con agua. Agregar 4 gotas (0.08 ml) de la solución CQC, mezclar y esperar 30 minutos, a temperatura ambiente para desarrollo de color.

Hacer la lectura de la intensidad del color con fotómetro equipado con filtro de 610 milimicras, restando el valor que alcanza la lectura del testigo a la de cada una de las soluciones patrones de fenol; finalmente, construir la curva estándar (esta curva debe ser una línea recta).

Si se pretende efectuar una comparación visual de los patrones, se conservan en el refrigerador y se prepara una nueva serie cada semana.

PROCEDIMIENTO:-

QUESOS.-

Dependiendo del tipo de queso y principalmente de su grado de maduración, debido a su mayor ó menor acidez, la técnica para determinación de la fosfatasa en ellos, varía fundamentalmente en la cantidad de amortiguadores y precipitantes que es necesario agregarles, para que la determinación esté siempre, dentro de los límites de pH establecidos como óptimos para la prueba.

TECNICA:

1. Pese por separado dos porciones de 0.5 g de queso sobre sendos cuadritos de papel encerado ó papel de estaño. Un cuadrito corresponde a la muestra y el otro al testigo.
2. Añada al testigo 1.0 ml de amortiguador de hidróxido de bario-borato aconsejado para el queso que esté analizando (Ver tabla anexa). Macere perfectamente por medio de un agitador de vidrio, dejando éste dentro del tubo y caliente después en

baño de agua hirviendo por un minuto (la temperatura del contenido del tubo debe ser 85-90°C). Enfríe a temperatura ambiente y vuelva a macerar.

3. A cada tubo con muestra agregue 1.0 ml de sustrato amortiguador aconsejado (Vea tabla anexa) y macere. De este paso en adelante, tanto el testigo como las determinaciones se tratarán de la misma manera. Agregue 9 ml más de sustrato amortiguador (total 10 ml) y mezcle; al retirar el agitador del tubo, límpielo con un trocito de 2.5 cm² de papel filtro y deje este papel engrasado dentro del tubo y a continuación tápese éste.

Para obtener resultados cuantitativos en muestras de origen desconocido ajuste el pH a 10.0-10.5 agregando gotas de solución 0.1N de Na₂CO₃ ó HCl.

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

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

6. Añada 1.0 ml del precipitante de proteínas aconsejado (Ver tabla anexa) y mezcle; el pH de la mezcla debe ser 9.0-9.1.

7. Filtre con papel Whatman No. 42 ó 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 (el pH de la mezcla debe ser 9.3-9.4).

9. Ponga cuatro gotas del reactivo del CQC, mezcle y deje desarrollar el color, en reposo, por 30 minutos a temperatura ambiente.

10. Determine la intensidad del color azul, ya sea con fotómetro ó por comparación con los tipos visuales.

a) Con fotómetro: Usando filtro de 610 milimicras, lea las intensidades del color del testigo y los tipos. Reste la lectura del testigo de las de los tipos y convierta los resultados a equivalentes de fenol, por comparación con la curva tipo, preparada según g2. Cuando se usa el fotómetro se puede omitir la extracción con alcohol butílico.

b) Por comparación con tipos visuales: En muestras que den más de 5 unidades compare colores con los tipos acuosos, preparados según g2.

11. Cuando se observa durante el desarrollo del color, que la prueba va a ser intensamente positiva (mayor de 20 unidades), y que cuatro gotas de CQC no van a ser suficientes para combinarse con todo el fenol, pipetee una alícuota adecuada a otro tubo, diluya a 10.0 ml con el amortiguador para dilución del color y añada dos gotas más de CQC. Con cada prueba diluya y trate el testigo de la misma manera. Si todavía la coloración fuera intensamente positiva, diluya nuevamente en igual forma hasta que el color final esté dentro de los límites de los tipos visuales ó de la curva del fotómetro. Después de la última adición de CQC, espere 30 minutos para el desarrollo del color, entonces haga la lectura. Para corregir las lecturas por la dilución multiplique por dos 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 usan 0.5 g de muestra y se añaden 11 ml de reactivos, multiplique el valor de la lectura por 4.4 para convertir a equivalentes de fenol por gramo de muestra (mg/g).

INTERPRETACION

Equivalentes de fenol mayores de 12 mg/g, indican pasteurización deficiente en la mayor parte de los quesos, con excepción del Port Salut, Camembert, Limburgo y algunos otros quesos maduros suaves, que pueden llegar a tener valores máximos de 16 μ g/g, y del queso cottage que raramente da lecturas mayores de 4 μ g/g.

T A B L I

MODIFICACIONES A LA PRUEBA DE FOSFATASA POR EL METODO II, A.O.A.C. (3), PARA DETERMINACIONES EN
DIFERENTES TIPOS DE QUESOS (18)

GRUPO	TIPO DE QUESO	Tiempo promedio de maduración, en semanas. (F)	Amortiguador buffer aconsejado para obre- ner pH óptimo de 9.85- 10.20 Ba(OH) ₂ · 8H ₂ O - H ₂ BO ₃ , g/l	Precipitante de proteínas aconse- jado. ZnSO ₄ · 7H ₂ O CuSO ₄ · 5H ₂ O, g/l ²
1	Crema	1	25 - 11	4.5 - 0.1
	Doble Crema	1	25 - 11	4.5 - 0.1
2	Asadero (=Oaxaca=Quesillo= Mozzarella) (B)	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	Cottage	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	Enchilado (G)	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	Fresco (=Frescal) (G)	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	Oaxaca	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	Panela balcánica	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	Requesón	1	25 - 11	6.0 - 0.1
	3	Chiapas (similar Edam)	-	25 - 11
Chihuahua (Cheddar = Chester) (C)	1 - 6	25 - 11	6.0	
Holandés (=Edam=Gouda) (D)	1 - 8	25 - 11	6.0	
Manchego (E)	1 - 4	25 - 11	6.0	
Patagrás (=Gouda en Cuba)	2 - 6	25 - 11	6.0	
Port Salut (=Natas(?) = Trapense)	1 - 4	25 - 11	6.0	
Provolone (=Provola)	1 - 4	25 - 11	6.0	
4	Amarillo (=procesado=Ameri- cano=Fundido)	-	26 - 11	6.0
	Camembert	1 - 4	26 - 11	6.0
	Cabrales	1 - 4	26 - 11	6.0
	Cotija (G y H)	2 - 6	26 - 11	6.0
	Gorgonzola	1 - 4	26 - 11	6.0
	Gruyere (=Suizo)	4 - 12	26 - 11	6.0
	Roquefort (=Azul)	1 - 4	26 - 11	6.0
	5	Añejo (G)	14 - 15	27 - 11
Reggianito (=Parmesano Argnt)	4 - 24	27 - 11	6.0	
Parmesano	4 - 24	27 - 11	6.0	

NOTAS DE LA TABLA:

- A. Para facilitar el análisis de estos quesos los hemos agrupado arbitrariamente, tomando en cuenta para ello solamente las cantidades de amortiguador y precipitante que requieren para estar dentro del pH óptimo de la determinación.

Si se desconoce el tiempo de maduración del queso, entonces se deberán hacer pruebas variando las cantidades de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 0.8\text{H}_2\text{O}$ en el buffer y del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en el precipitante, siguiendo el criterio de que mientras más joven esté el queso, se requerirán menos hidróxido de bario, (aunque prácticamente nunca, menos de 25 g/l) y la adición en el precipitante de 0.1 g/l del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Obsérvese que las cantidades de H_3BO_3 del amortiguador y del $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en el precipitante, permanecen constantes, con excepción del sulfato de zinc en el precipitante de quesos crema.

El pH de la mezcla queso-buffer debe ser 9.85-10.20.

- B. Tanto el popular queso ó quesillo de Oaxaca, como los denominados "Asaderos", parten de la técnica conocida como quesos de pasta filata, de los cuales uno de sus más populares representantes es el Mozzarella. Sin embargo, en México tienen características ligeramente diferentes.
- C. El Chihuahua es en realidad un queso "Cheddar Verde", es decir, con un tiempo de maduración muy corto. En México, Chihuahua, Cheddar y Chester, son prácticamente el mismo queso.
- D. En México, dentro de la denominación "Holandés", generalmente se involucran: "Edam" y "Gouda".

- E. La denominación común en México muchas veces no corresponde exactamente al tipo de queso de que se trata, ya sea en su país de origen o en diferentes regiones del país. p.c. en México, al que se denomina Manchego, no tiene ni remotamente un leve parecido con el Manchego Español original. Este en general, es elaborado de leche de oveja y es un queso duro de maduración media de dos meses. El hecho en México es de leche de vaca, semi-blando y de maduración muy corta (hasta períodos inferiores a 15 días, dependiendo de la demanda).
- F. En términos generales el tiempo de maduración de los quesos tipo importado, que se elaboran en México, tienen un período de maduración más corto que los quesos en su país de origen, lo cual probablemente es debido a que el público nacional demanda productos cuyo sabor no sea muy intenso.
- G. En México se autoriza oficialmente la elaboración de este queso con leche cruda, siempre y cuando no se venda antes de un período de maduración mínima de 100 días, sin embargo, con esta maduración prácticamente no se encuentra en el mercado, por lo cual, además por su elevado contenido de humedad, recomendamos clasificarlo y analizarlo como "Fresco o Frescal".
- El llamado "queso enchilado" prácticamente es un "añejo" frescal" (valga la paradoja), al cual le han untado en la superficie polvo colorante mezclado con chile molido.
- H. Cotija. Este podría ser el más parecido a la clasificación reglamentaria de "añejo", sin embargo, su maduración, aunque un poco mayor que la del "añejo frescal", tampoco corresponde en general, a más de 100 días.

Como se utilizó el espectrofotómetro ó fotocolorímetro para hacer la lectura de las muestras, es necesario entender los principios de la espectrofotometria y explicar el porqué se realiza la curva tipo, la aplicación de la ley de Lambert Beer, la densidad óptica, etc.

PRINCIPIOS DE ESPECTROFOTOMETRIA

La espectroscopia ultravioleta, infrarroja y de resonancia magnética nuclear, son las técnicas más importantes que utiliza actualmente el químico orgánico para obtener información sobre una determinada sustancia.

El estudio de la espectroscopia está dividido en: espectroscopia de emisión y de absorción. Se obtiene un espectro de emisión por el análisis espectroscópico de una fuente de luz, como puede ser una llama ó un arco eléctrico. Este fenómeno es causado, fundamentalmente por la excitación de átomos por medios térmicos ó eléctricos; la energía absorbida induce los electrones, que se encuentran en un estado fundamental, a un estado de mayor energía. La energía absorbida se libera en forma de luz. La luz fluorescente y los colores obtenidos por el calentamiento de sales de determinados elementos en una llama son ejemplos de espectros de emisión. En algunos casos, los estados excitados pueden tener un período de vida apreciable, como es el caso de emisión de luz continua después que la excitación ha cesado; este fenómeno se denomina "fosforescencia".

Un espectro de absorción se obtiene colocando la sustancia entre el espectrómetro y una fuente de energía que proporciona radiación electromagnética en el intervalo de frecuencia a estudiarse. El espectrómetro analiza, para una determinada frecuencia, la energía transmitida con referencia a la energía incidente. Igualmente los estados más energéticos poseen un período de vida más corto. La principal consecuencia

resultante de la energía absorbida en la región infrarroja, es el calor. La característica principal de la energía absorbida en la región ultravioleta, es la reemisión de luz.

En los últimos veinte años, la instrumentación ha progresado de tal forma que se dispone de una gran variedad de instrumentos automáticos. La frecuencia se cambia continuamente, y la energía transmitida se analiza automáticamente.

Aunque se utilizan otras, la unidad más usada para medir la longitud de onda de las regiones visible y ultravioleta, es el Milimicron ($m\mu$ 10-7cm); en la región infrarroja, es el Micrón (μ 10-4 cm) y el número de onda (cm^{-1}) que representa el número de ondas por centímetro. Las regiones de mayor interés para el químico orgánico son 200-400 $m\mu$ (ultravioleta), 400-800 $m\mu$ (visible) y 2-16 (infrarrojo). El proceso fundamental es la absorción de una cierta cantidad de energía. La energía necesaria para la transmisión de un estado de baja energía a un estado de mayor energía, está directamente relacionada a la frecuencia de la radiación electromagnética que causa la transición.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA.-

Para obtener una información útil del espectro visible ó ultravioleta, debemos medir cuidadosamente la longitud de onda del máximo de absorción (a_{max}) y la intensidad de esta absorción. En nuestro caso utilizamos una longitud de onda de 610 milimicras ($m\mu$). El compuesto debe disolverse en un solvente apropiado, el cual no debe absorber luz en la región que se está estudiando. El solvente más usado es el alcohol etílico al 95%, pero también se utilizan normalmente agua y héxano.

El recipiente en el cual se coloca la solución debe ser transparente a la luz, en la región estudiada. Si bien el vidrio

común puede utilizarse satisfactoriamente en la región visible, este absorbe ligeramente luz ultravioleta, y en esta región deben utilizarse celdas de cuarzo. Las celdas más utilizadas miden 1 cm. de espesor. Los espectrofotómetros modernos entregan un gráfico de la intensidad de luz transmitida ó absorbida, vs. longitud de onda. La fuente de luz más conveniente en la región ultravioleta (180-400 μ) es la lámpara de descarga de Hidrógeno. Para la región visible del espectro (400-800 μ) se utiliza una lámpara con filamento de tungsteno. La mayoría de los espectrofotómetros son instrumentos de doble haz, en los cuales la principal fuente de luz se escinde con dos rayos: uno de ellos atraviesa la celda que contiene la solución, y el otro atraviesa la celda que contiene el solvente. El espectrofotómetro su traé electrónicamente la absorción del solvente de la absorción total de la solución. Así, los efectos de la absorción de luz, causados por el solvente, son mínimos.

Los espectrofotómetros comunes visible ó ultravioleta entregan espectros aceptables en la región 220-800 μ . Instrumentos más perfeccionados poseen adelantos mecánicos que extienden la longitud de onda corta a valores cercanos a 185 μ .

La mayoría de los espectrofotómetros entregan gráficas que relacionan la longitud de onda vs. absorbencia. La absorbencia A o densidad óptica se define por:

$$A = \log. \frac{I_0}{I}$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, e I la intensidad de luz transmitida.

El valor de absorbencia comunmente registrado es 0-2,0. El cálculo de la intensidad de una banda de absorción implica la aplicación de las leyes de Lambert Beer. La ley de Lambert Beer afirma que la intensidad de la luz transmitida a

través de un medio homogéneo, disminuye geométricamente a medida que el espesor de la muestra aumenta aritméticamente. La ley de Beer afirma que cada molécula de soluto absorbe la misma fracción de luz incidente independientemente de la concentración en un medio no absorbente.

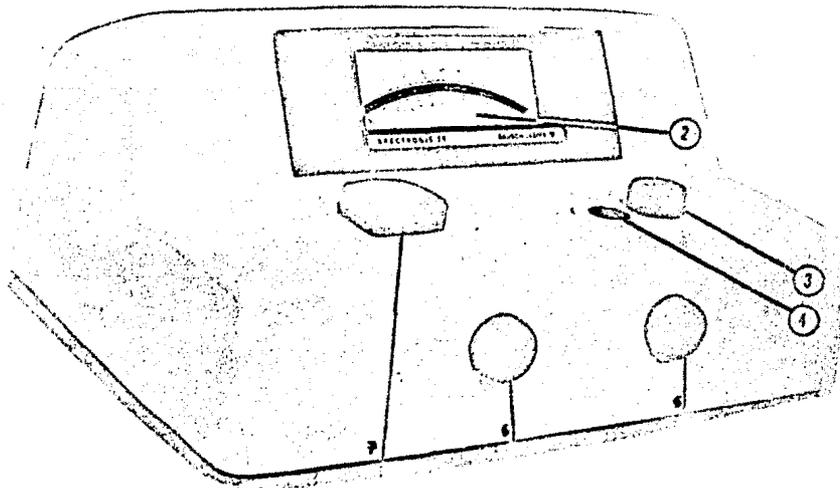
Esta ley no se refiere a soluciones en general, sino sólo a aquellas muy diluídas, como es el caso en espectrofotometría ultravioleta, y por lo tanto, las desviaciones son mínimas.

MODO DE EMPLEO DEL ESPECTROFOTOMETRO O FOTOCOLORIMETRO

Se utilizó el Spectronic 20 Bausch and Lomb - Regulated Model 59.

ESPECTROFOTOMETRO

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 2. Medidor | 5. Control de Luz |
| 3. Control de Longitud de Onda. | 6. Switch de Encendido y Control Cero |
| 4. Escala de Longitud de Onda. | 7. Recipiente para Muestra. |



1. Una vez conectado el espectrofotómetro, se dá vuelta al botón de la izquierda y se deja calentar durante 10 a 15 minutos.
2. Se selecciona la longitud de onda apropiada; en nuestro caso utilizamos una longitud de 610 milimicras.
3. Se ajusta el espectrofotómetro a cero % de la transmitancia por medio del botón de la izquierda, sin tubo y con la cubierta cerrada para que no entre luz.
4. Se llena el tubo del espectrofotómetro hasta la marca con líquido de la muestra del tubo testigo. Se introduce y se ajusta a 100% de transmitancia por medio del botón de la derecha ó control de luz.
5. Una vez ajustado el aparato a 100% de transmitancia, se saca el tubo del espectrofotómetro, se le agrega un poco de contenido del líquido de la muestra problema, se agita, se enjuaga y se llena hasta la marca, se vuelve a introducir, se cierra la tapa para que no entre luz y se hace la lectura directamente del % de transmitancia ó absorbencia. Es recomendable comenzar por las muestras que resulten menos coloreadas.
6. Al % de transmitancia obtenido se le saca la densidad óptica (D.O.) por medio de la siguiente fórmula:

$$D.O. = 2 - \text{logaritmo del \% de transmitancia del problema}$$

ya que para el cálculo de la intensidad de una banda de absorción implica la aplicación de las leyes de Lambert y Beer.

7. Después sacamos el coeficiente ó factor, por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración}}{\text{Densidad Optica (D.O.)}}$$

La concentración se refiere a los microgramos de fenol/ml ó patrones de fenol, por ejemplo: 0.5, 1, 3, 5, 10, 20, 30, y 40 ug/ml, utilizados para la realización de la curva tipo. (Esta curva debe ser una línea recta).

8. Una vez obtenidos los factores, se saca un factor promedio; para queso pasteurizado, se multiplica por 4.4, y por 50 para queso crudo para corregir las lecturas por la dilución, ya que es necesario hacer primero una dilución 1:9 seguida por la dilución 2:8.

Factor promedio 57.50, obtenido por medio de la curva tipo.

Factor promedio para queso pasteurizado $57.50 \times 4.4 = 253$

Factor promedio para queso crudo, $253 \times 50 = 12650$

9. Para sacar los microgramos de fenol por gramo de muestra (ug fenol/g), se hace lo siguiente:

Lectura de la D.O. x Factor promedio = microgramos de
fenol/g de muestra.

10. Ahora bien, se puede hacer la lectura por comparación de la intensidad del color azul con los tipos visuales ó patrones de fenol, pero es necesario conservarlos en el refrigerador y preparar una nueva serie cada semana, por lo que es preferible determinar la intensidad del color azul con el espectrofotómetro.

ug. fenol/ml	Z	D.O.	F
0.5	98	0.0087	57.47
1	95	0.0222	45.74
5	90	0.0457	65.64
5	82.5	0.0835	59.86
10	66.5	0.1772	56.42
20	43	0.3867	57.68
30	31	0.5026	58.96
40	21	0.6778	59.01

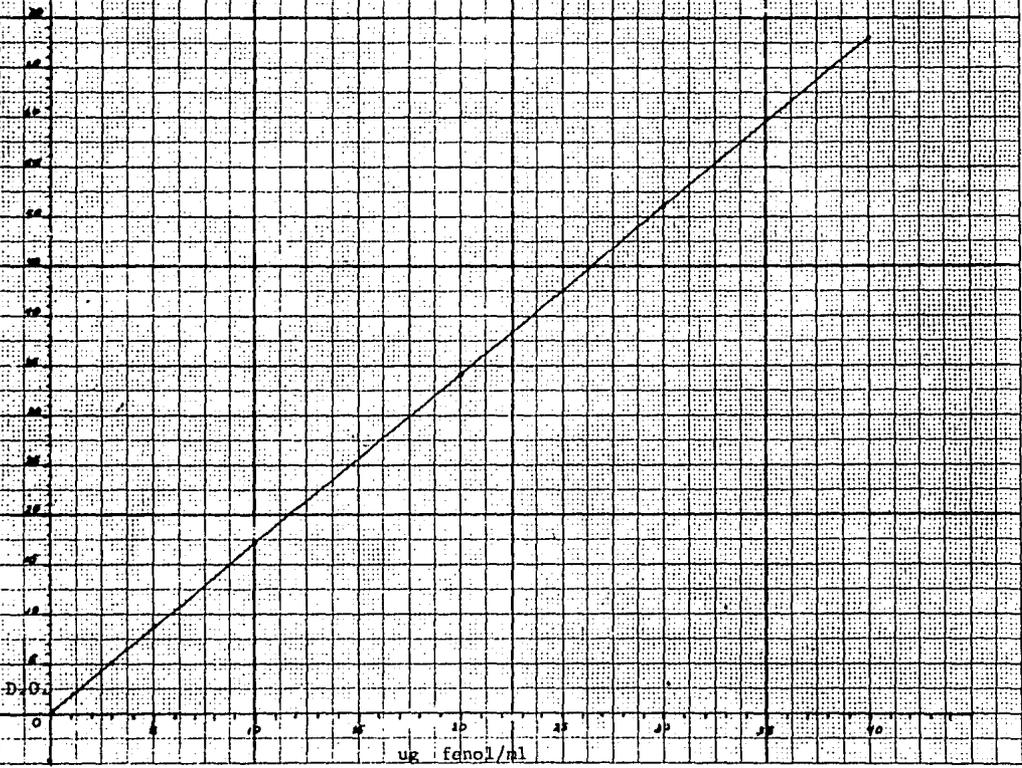
FACTOR PROMEDIO = 57.50

LECTURA POR FACTOR = ug. de fenol

PARA QUESO PASTERIZADO: LECTURA x 57.50 x 4.4 (253) = ug. de fenol/g. de queso.

PARA QUESO CRUDO: LECTURA x 57.50 x 4.4 x 50 (12550) = ug. de fenol/g. de queso.

CURVA TIPO



R E S U L T A D O S

Hemos agrupado los cien quesos analizados en cuanto al país de origen, obteniendo los siguientes resultados:

	<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/g</u>
FRANCIA							
(*)+ 1	Limburger Allgaver	suave		Mal paster.	45.4	0.3429	86.73
+ 2	Gaperon D'Auvergre	duro		Mal paster.	45 x 50	0.3467	4384.2
+ 3	Camembert	suave		Mal paster.	68 x 50	0.1674	2116.8
4	Boursin	semi-duro		Bien paster.	91	0.0409	10.35
5	Le Cente- naire	Camembert suave		Bien paster.	92	0.0362	9.15
+ 6	Pont Lévêque Augedor	suave		Mal paster.	56 x 50	0.2518	3184.3
+ 7	Camembert Fermiers Normands	suave		Mal paster.	56	0.2518	63.68
+ 8	La Chevre Blanche - (Fromage de Chevre)	suave		Med. paster.	59	0.2291	57.95
+ 9	Virlux	duro		Med. paster.	13.5	0.8677	219.4
10	Fundido Extra-graso	duro		Bien paster.	100	0	0
+ 11	Roquefort	semi-duro		Med. paster.	66.10 x 50	0.1797	45.46
+ 12	Domalait	duro		Bien paster.	83.0	0.0806	20.39
+ 13	Kaas	duro		Bien paster.	75	0.1249	31.59
14	Safi Port Salut	duro		Bien paster.	92	0.0367	9.15
+ 15	Camembert Kummelli	suave	2936	Med. paster.	18.5	0.7328	185.3
+ 16	Camembert President Haute Marque	suave	2974	Med. paster.	58.5	0.2328	58.88
+ 17	Le Charoux (leche cabra)	suave	2957	Bien paster.	81.5	0.088	22.46
+ 18	Felix Potin Emmental	duro	3027	Med. paster.	18	0.7447	188.34

(*) El signo (+) significa que estos quesos resultaron mal pasteurizados.

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	Técnica No. 1 <u>Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	Técnica No. 2 <u>Cuantitativo ug/fenol/g</u>
FRANCIA						
+ 19 Cabritta	Suave (leche cabra)	3063	Med. Paster.	83.5	0.0783	19.80
+ 20 Societé Roquefort	semi-duro	3063	Med. paster.	4	1.3979	353.5
+ 21 Saint Saviol	suave (leche cabra)	3063	Med. paster. (a azul)	56.5	0.2479	62.70
+ 22 Goumertte des Dômes	semi-duro	3063	Med. paster	64	0.1938	49.01
+ 23 Banon Du Dauphin	duro	3063	Med. paster (a café)	83	0.0809	20.46
+ 24 Le Soignon (Fromage de Chevre Poitov)	suave		Med. paster.	53.5	0.2716	68.70
+ 25 Lanquetot Camembert Normandie	suave	3125	Mal paster.	55.5	0.2557	64.67
+ 26 Pont Lúveque Pays D'auge	Suave	3137	Mal. paster.	36	0.4436	112.21
27 Chevre	suave	3137	Med. paster.	94	0.0268	6.79
+ 28 Coutommiers Camembert	suave	3188	Mal. paster	81	0.915	23.14
+ 29 Beulet Haute Savoie	blando	3187	Mal paster.	4.5	1.3467	340.6
+ 30 Chaurce	suave	3188	Med. paster	82	0.0861	21.79
31 Boursin (de ajo)	semi-duro	3229	Bien paster (café Obsc.)	93	0.0315	7.96
32 (Fromage de Chevre) Bougon	Le suave	3291	Med. paster. (a café)	95	0.0222	5.80
33 Crème des Prás	blando (q. crema)	3332	Bien paster.	100	0	0
34 Tartare au Poivre	semi-duro	3336	Med. Paster (a café)	73	0.1367	34.57

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/g</u>
<u>FRANCIA</u>						
35 Gervais Carré (Fromage Normandie)	blando		Bien paster.	100	0	0
36 Caprice des Dieux	semi-duro		Bien paster.	90	0.0458	11.58
+ 37 Rouy	suave	S/A	Mal paster.	84	0.0757	19.14
+ 38 Geramont Camembert	suave	S/A	Mal paster	80	0.0969	24.50
+ 39 Chaurce	suave	3063	Mal paster.	21	0.6778	171.48
<u>HOLANDA</u>						
40 Beledam Bola roja	duro		Bien paster	94.8	0.0230	5.83
41 Eyssen Fundido	duro		Bien paster	100	0	0
42 Ardennerham Eyssen	duro		Bien paster	98	0.0087	2.21
+ 43 Edam Bola roja Frico(carretilla)	duro		Bien paster.	62	0.2076	52.50
44 Cloverleaf Brand, Bola roja	duro	2870	Bien paster.	90	0.0457	11.5
+ 45 Cristalina (q. crema)	blando	3101	Med. paster. (a café)	86	0.0655	16.56
46 Edam	duro	3188	Bien paster.	48	0.0087	2.21
47 Volendam	duro	3188	Med. paster.	90	0.0458	11.58
48 Baby Couda Et. roja (envuelto)	duro	3167	Bien paster.	95	0.0222	5.80
+ 49 Queso Fresco S/M	blando	3248	Med. paster.	19	0.7212	182.39

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/g.</u>
<u>HOLANDA</u>						
50	Keus C° Alphen Baby Gouda	duro 3248	Bien paster.	99.5	0.0022	0.55
+ 51	Clara Maria Baby Gouda Boeren Kass	duro 3263	Mal paster.	2.5	1.6882	426.96
52	Westland	duro 3342	Bien paster.	100	0	0
+ 53	Room Kaas Specialité	duro 3341	Bien paster.	83	0.0809	20.46
54	Hompy Smeer Kaas Volvet eru	duro 3341	Bien paster.	98	0.0087	2.21
55	Moneho Cupehe	semi-duro 3336	Bien paster.	100	0	0
<u>ESPAÑA</u>						
+ 56	Bola Roja	duro	Mal paster.	42 x 50	0.3767	4764.2
57	El Caserío	duro	Bien paster.	97.5	0.0109	2.78
58	Larsa Trebol Bola	duro	Bien paster.	99	0.0043	1.10
59	Campo Real	semi-duro 3188	Bien paster.	89	0.0506	12.79
60	S/M	duro 3288	Bien paster.	95.5	0.0291	7.38
+ 61	Gruyere (leche Oveja)	duro 3288	Mal paster.	4.5	1.3925	352.17
+ 62	Roquefort	semi-duro 3288	Mal paster.	60	0.2218	56.09
63	S/M	suave 3288	Mal paster.	99	0.0043	1.10
+ 64	Boffard (l. oveja)	semi-duro 3551	Mal. paster.	80	0.0969	64.50

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/g</u>
<u>ALEMANIA</u>						
65	Champignon suave Camembert (enlatado)		Bien paster.	100	0	0
66	Edelweiss suave Brie		Bien paster.	100	0	0
+ 67	Romadur suave Camembert	2936	Mal paster.	23	0.6382	161.42
+ 68	Consul suave Camembert	2936	Med. paster.	81	0.091	23.14
69	Holsteiner duro	3369	Med. paster. (a. café)	100	0	0
70	Piroshka semi-duro Hochland	3369	Bien paster.	100	0	0
71	Champignon suave Hochland	3369	Bien paster.	100	0	0
72	Deifter semi-duro Hochland	3369	Bien paster.	100	0	0
<u>ARGENTINA</u>						
+ 73	Chudut duro		Mal paster.	75 x 50	0.1249	1579.4
+ 74	"La Esperanza" duro		Mal paster.	57.8 x 50	0.2373	3001.5
+ 75	S/M semi-duro Roquefort	2876	Med. paster.	11	0.9586	242.4
76	Adler c/ fundido Jamón (duro)		Bien paster.	100	0	0
77	San Cor fundido Gruyere (duro)		Bien paster,	100	0	0
+ 78	S/M duro		Med. paster. (gris osc.)	2	1.6990	429.69
+ 79	Santa Rosa duro Cheddar	3757	Bien paster	71	0.1487	37.49
+ 80	Santa Rosa semi-duro Roquefort	3757	Mal paster.	27	0.5767	145.86

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probi.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/g</u>
<u>COLOMBIA</u>						
+ 81	S/M fresco		Med. paster.	69.2	0.1597	40.38
+ 82	S/M Casero fresco	2645	Mal paster.	40 x 50	0.3979	5032.9
+ 83	S/M Casero fresco		Mal paster.	32.1 x 50	0.4923	6226
+ 84	El Triunfo duro	2920	Mal paster.	76.5	0.1163	29.42
85	Alpina Fundido duro	2920	Bien paster.	100	0	0
86	Cachocavallo fresco	3096	Med. paster.	96	0.0177	4.48
+ 87	S/M Casero duro	3204	Mal paster	1	2	505.82
<u>ECUADOR</u>						
88	Lechera Fundido Ahumado duro	2873	Med. paster.	91	0.0409	10.35
+ 89	San Pedro fresco	2872	Mal paster.	75 x 50	0.1249	1579.9
+ 90	Gonzalez fresco	2874	Mal paster.	51.5 x 50	0.2881	3644.3
+ 91	S/M Casero fresco	2874	Mal paster.	11	0.9586	242.4
<u>VENEZUELA</u>						
+ 92	Parmesano duro	2910	Med. paster.	62 x 50	0.2076	2625.3
93	S/M - Añejo duro	3091	Med. paster.	93.5	0.0291	7.38
+ 94	S/M duro	3406	Mal paster.	40.5	0.3925	99.26
<u>U.R.S.S.</u>						
+ 95	S/M semi-duro		Med. paster.	55	0.2596	65.66
+ 96	Sertylzycki duro	3549	Bien paster. (café claro)	77	0.1135	29.42
97	Serpetnoilosty Warmins duro	3549	Med. paster.	100	0	0
<u>BULGARIA</u>						
98	White Brined semi-duro (leche borrega)	3327	Bien paster.	99.5	0.0022	0.55
+ 99	S/M semi-duro	3327	Med. paster. (gris osc.)	78	0.1079	27.28
<u>DINAMARCA</u>						
+ 100	Blue Castello (q. azul) semi-duro		Mal paster	28	0.5528	139.8

NOTA: Además se incluyen en esta lista algunos quesos que fueron decomisados en tiendas y que habían sido introducidos ilegalmente al país, así como a través de permisos de importación, y otros quesos decomisados a pasajeros como equipaje.

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/gr.</u>
<u>E.U.A.</u>						
101 Bonbel (La vaca que ríe)	duro	(ilegal)	Bien paster.	100	.0	0
<u>DINAMARCA</u>						
102 Boel Brie (enlatado)	maduro suave	(ilegal)	Bien paster.	100	0	0
103 Tolko Camembert (enlatado)	maduro suave	(ilegal)	Bien paster.	100	0	0
<u>HOLANDA</u>						
104 Gouda (Fromage Fondue (enlatado)	(fundido) duro	(ilegal)	Bien paster.	100	0	0
105 Gouda (enlatado)	duro	(ilegal)	Bien paster	99	0.0043	1.10
106 Edam	duro	3272	Bien paster.	99	0.0043	1.10
107 S/M	duro	3288	Bien paster.	92	0.0362	9.15
+ 108 Edam Frico (carretilla)	duro	3540	Bien paster. (café osc.)	80	0.0969	24.50
<u>FRANCIA</u>						
+ 109 Genuine Brie	maduro suave	(ilegal)	Med. paster.	85.5	0.068	17.19
+ 110 S/M	duro		Mal paster.	81.5 x 50	0.0888	1122.9
+ 111 S/M	semi-duro		Med. paster.	10	-1	252.91
112 S/M (q. crema)	blando		Bien paster.	98.5	0.0065	1.66

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	Técnica 1 <u>Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	Técnica 2 <u>Cuantitativo ug/fenol/g</u>
<u>FRANCIA</u>						
113 Brie	suave		Bien Paster.	100	0	0
114 La Vache Qui Rit (q. fundido)	duro		Bien paster.	100	0	0
+ 115 Au Lait de Chevre	suave (leche cabra)	(ilegal)	Med. paster.	78	0.1079	27.29
+ 116 Brie Marco	maduro suave	(ilegal)	Mal Paster.	26.5	0.5767	145.86
117 Courmandise (Fromage Fondue)	duro (fundido)	(ilegal)	Med. Paster.	100	0	0
+ 118 Veritable Pur Chevre Fermier	suave o (leche cabra)		Med Paster. (gris claro)	64	0.1938	49.01
+ 119 S/M	duro	3244	Med. Paster.	4	1.3979	353.5
<u>ALEMANIA</u>						
120 Brie Champignon (enlatado)	maduro suave	(ilegal)	Bien Paster.	100	0	0
121 Edelweiss Camembert (enlatado)	maduro suave	(ilegal)	Bien paster.	100	0	0
<u>ARGENTINA</u>						
+ 122 Bavaria Roquefort	Semi- duro	Permiso Import	Mal Paster.	13.5	0.8696	219.29
+ 123 Sancor	Semi- duro	Permiso Import.	Med. paster.	81	0.091	23.14
+ 124 Colonia	duro	Permiso Import.	Med. Paster.	19	0.7212	182.39
125 Colonia Monte	duro	Permiso Import.	Med. paster.	100	0	0
+ 126 Colonia Vega	duro	Permiso Import.	Mal Paster.	42.5	0.3716	93.70

<u>Marca</u>	<u>Tipo</u>	<u>Acta de decomiso</u>	<u>Técnica 1 Cualitativo Pasterindex</u>	<u>% Transmitan za del Probl.</u>	<u>D. O.</u>	<u>Técnica 2 Cuantitativo ug/fenol/g</u>	
<u>ITALIA</u>							
+ 127	Parmasan duro		Bien paster.	65	0.1870	47.31	
128	Parmegiano duro		Bien Paster.	91.5	0.0385	9.75	
<u>NORUEGA</u>							
129	Ski Queen semi-duro G Jeltost		Bien Paster.	100	0	0	
<u>PANAMA</u>							
+ 130	S/M Casero fresco	2925	Med. Paster	40 x 50	0.3098	3917.6	
<u>SUIZA</u>							
+ 131	Switzerland duro	(ilegal)	Bien Paster.	23	0.6382	161.42	
132	Swiss Knight Fondue	duro fundido	Med. Paster. (a café)	100	0	0	
<u>BOLIVIA</u>							
+ 133	S/M duro	3075	Mal Paster.	23	0.6382	161.42	
<u>FINLANDIA</u>							
134	Valio Gruyere	duro	3240	Bien paster.	91	0.0409	10.35
<u>ESPAÑA</u>							
+ 135	S/M fresco	3271	Med. Paster	16	0.7959	201.29	
<u>JAPON</u>							
+ 136	Gilead Caccio- Cavallo	duro	3330	Med. Paster. (a café)	69	0.1597	40.30

COMENTARIOS A LOS RESULTADOS

1. Por medio de las pruebas realizadas, la mayoría de los resultados obtenidos y considerados como bien pasteurizados y medianamente pasteurizados con el método cuali-
tativo Pasterindex, presentaron una coloración entre gris y café, ya sea más oscura ó más clara. El proble-
ma consiste en que no se sabe que dato tomar en cuenta, si es que está realmente bien pasteurizado ó medianamen-
te pasteurizado, por lo que, muchas veces para evitarse problemas, se dá un resultado como medianamente pasteuri-
zado, que en todo caso, indica pasteurización insuficien-
te ó mala pasteurización. Sin embargo, al comparar con el método cuantitativo de Sanders y Sager, en microgramos de fenol por gramo de muestra, se obtiene un resultado en estos casos considerados como medianamente pasteurizados un 29% de bien pasteurizados (menor de 12 a 16 ug de fe-
nol/g de muestra), con otro 71% de quesos mal pasteuriza-
dos, (con 12 a 16 ó más ug de fenol/g de muestra). De allí la importancia de realizar la cuantificación de la fosfatasa en ug de fenol por gramo de muestra.

2.	Técnica No. 1	Técnica No. 2
	<u>Método Pasterindex-Cualitativo</u>	<u>Método de Sanders y Sager</u> <u>Cuantitativo</u>
	Bien <u>pasteurizados</u> 39%	Bien <u>pasteurizados</u> 40%
	Med. <u>pasteurizados</u> 31%	Mal <u>pasteurizados</u> 60%
	Mal <u>pasteurizados</u> 30%	

En base a los resultados obtenidos se demuestra que exis-
te una alta incidencia de derivados lácteos con una dudo-
sa pasteurización, por lo que es muy importante determi-
nar mediante métodos exactos, el que se realice adecuada-
mente.

D I S C U S I O N

1. Del análisis de los cien quesos utilizados en este trabajo, se observó lo siguiente:
 - Con el método cualitativo "Pasterindex", el 30% de los productos muestreados resultaron mal pasteurizados, el 31% medianamente pasteurizados y el 39% bien pasteurizados.
 - Con el método cuantitativo de Sanders y Sager, el 60% de los productos resultaron mal pasteurizados, (con más de 12 a 16 ug de fenol/g de muestra), y el 40% resultaron bien pasteurizados, (con menos de 12 a 16 ug de fenol/g de muestra).

2. Se analizaron 39 quesos Franceses, de los cuales el 71.7% resultaron mal pasteurizados de acuerdo con el método cualitativo y el 74.3% con el método cuantitativo.

Se analizaron nueve quesos de España, de los cuales el 33.3% resultaron mal pasteurizados con el método cualitativo y el 33.3% con el método cuantitativo.

Se analizaron ocho quesos de Alemania, con un resultado del 37.5% de mal pasteurizados con el método cualitativo y el 25% con el cuantitativo.

Se analizaron ocho quesos de Argentina, de los cuales el 62.5% resultaron mal pasteurizados con el método cualitativo y el 75% con el método cuantitativo.

Se analizaron siete quesos procedentes de Colombia, resultando el 87.7% mal pasteurizados según el método cualitativo y el 71.4% con el método cuantitativo.

3. Un 20% de los resultados obtenidos por el método cualitativo Pasterindex como medianamente pasteurizados, al hacer la comparación con la escala de colores, mostraron un franco color gris, más claro ó más oscuro, pero sí coincidieron con los resultados obtenidos por el método cuantitativo de Sanders y Sager, en mayor ó menor proporción en microgramos (ug) de fenol por gramo de muestra.
4. Hay que hacer notar que el 82% de los casos considerados como bien pasteurizados por el método Pasterindex, y que al comparar con la prueba cuantitativa de Sanders y Sager efectivamente estaban bien pasteurizados, encontrando resultados menores de 12 a 16 ug de fenol/g de muestra.
5. Respecto a los quesos diagnosticados por el método cualitativo Pasterindex como mal pasteurizados, el 100% de ellos, al comparar los resultados con el método cuantitativo de Sanders y Sager, nos indica que son quesos elaborados con leche cruda ó ligeramente calentada, destruyéndose parte de la fosfatasa.
6. En cuanto al tipo de queso, se observó una mayor incidencia de mal pasteurizados en los siguientes:
 - Quesos sin marca (S/M) de fabricación casera.
 - Quesos Roquefort, tipo semi-duro (línea quesos azules)
 - Quesos de leche de cabra.
 - Quesos suaves como el Camembert y el Brie.
 - Quesos de leche de oveja.
7. Con los quesos fundidos se obtuvo 0 ug de fenol/g de muestra, ya que como su nombre lo indica, necesitan fundirse para su elaboración, y por lo tanto, invariablemente hay destrucción de la fosfatasa.

8. De los quesos típicos con especias, v.g. el clásico Boursin (Francés), con ajo ó pimienta, resultaron bien pasteurizadas dos muestras analizadas: Una con 10.35 ug y otra con 7.96 ug de fenol/g de muestra, de allí que se considera no haber detectado fosfatasas vegetales ó fosfatasa reactivada en este tipo de quesos.
9. Todos los quesos sin marca de fabricación casera, resultaron mal pasteurizados.
10. Los quesos que en el membrete especificaban que estaban elaborados con leche pasteurizada, la mayoría resultaron negativos a la prueba de la fosfatasa, salvo los quesos maduro-suave, marca "Genuine Brie", el Brie marca "Marco", ambos procedentes de Francia, que habían sido introducidos al país ilegalmente, y los quesos tipo semi-duro Roquefort, marca "Bavaria" y "Sancor", que incluso poseen certificado sanitario de Argentina.
11. Se analizaron 12 quesos que habían sido introducidos al país ilegalmente, que fueron decomisados en tiendas, de los cuales ocho resultaron bien pasteurizados y cuatro mal pasteurizados.
12. Se analizaron dos quesos tipo Roquefort (semi-duro) introducidos al país mediante permiso de importación, uno marca "Bavaria" y otro marca "Sancor", resultando ambos mal pasteurizados, procedentes los dos de Argentina. Asimismo, se analizaron tres quesos duros procedentes de Argentina e introducidos al país mediante permiso de importación, uno marca "Colonia", otro marca "Vega", que resultaron mal pasteurizados y otro marca "Monte" que resultó bien pasteurizado.
13. También se analizaron seis quesos enlatados, los que resultaron todos bien pasteurizados.

14. La fosfatasa puede reactivarse, lo cual sucede ocasionalmente, cuando la temperatura ó tiempo de sostenimiento no han sido adecuados, aunque es muy improbable que suceda en la leche empleada para la elaboración de quesos por medio de la pasteurización comercial, ya sea lenta ó rápida, no así en la ultrapasteurización y aseptización, en donde es muy frecuente que haya reactivación al cabo de algunos días de almacenamiento a bajas temperaturas.

15. También puede haber reacciones falsas positivas de fosfatasa en productos bien pasteurizados, especialmente cuando se trata de huellas de fenol en el material usado, p.e., el uso de tapones de plástico derivados de resinas sintéticas, ó incluso por estratos de vainilla, pimienta, u otras especias utilizadas en la elaboración de ciertos quesos, pero haciendo notar que en este estudio no se encontró ningún caso evidente por contaminación de fenol ó presencia de éste en las especias agregadas en la fabricación del queso.

16. Otra causa de falsas reacciones positivas puede ser la presencia de bacterias que producen fosfatasa, tales como algunas cepas de Pseudomonas, Lactobacillos, Thermophilus, gérmenes del grupo Escherichia-Aerobacter, etc.; sin embargo, se han descrito métodos para diferenciar la fosfatasa microbiana de la bovina, haciendo notar que es menos el riesgo de la producción de fosfatasa microbiana en el queso que en la leche u otro producto derivado de ella, debido a que la mayoría de los gérmenes productores de fosfatasa son susceptibles de acidez, y por lo tanto, deben alcanzar con más dificultad el número suficiente para dar positiva la prueba.

17. El fenol utilizado para la elaboración de los patrones de fenol necesarios para preparar la curva tipo, ó para hacer la lectura de las muestras directamente por la comparación visual con los tipos de fenol, en ocasiones se hidrata, sobre todo cuando es manejado inadecuadamente. Por ejemplo, cuando se deja mal tapado el frasco, ó por el uso de fenol viejo, proporcionando resultados erróneos, pero existen técnicas especiales para determinar la hidratación del fenol, por lo que se recomienda el uso de fenol nuevo no hidratado para la elaboración de los patrones fenol, ó bien realizar la lectura de las muestras directamente con el espectrofotómetro.

18. En virtud del tráfico considerable de producto de origen animal a través del Aeropuerto Internacional de la ciudad de México, y el riesgo que significa que estos productos sirvan de vehículo para la introducción al país de enfermedades exóticas, es muy importante que los derivados lácteos, entre ellos los quesos transportados como equipaje ó bien como carga mediante permisos de importación, comprobar con un método preciso, el que vengán bien pasteurizados.

Por lo tanto, basando nuestros argumentos en tales hechos, solo podrá permitirse la importación de quesos en cuya fabricación se hayan empleado leches pasteurizadas y que dicho proceso se haya efectuado a nivel industrial, debiendo estar claramente marcada la leyenda "PASTEURIZADO" en la etiqueta que acompaña al producto; en los casos en los cuales no exista dicha leyenda, ó bien sean de procedencia casera, deberá invariablemente practicarse la prueba de la fosfatasa, y en caso de resultar positiva, deberá incinerarse el producto, mediante los procesos legales establecidos, caso contrario, es decir, fosfatasa negativa, ó bien que la marca del queso se encuentre en las listas de los quesos que han sido analizados y hayan

resultado negativos, deberá entregarse dicho producto al pasajero ó importador al que le fue decomisado, debiendo éste, darse por recibido del producto firmando de conformidad.

CONCLUSIONES

1. El método colorimétrico Pasterindex es rápido y eficiente para la determinación de la pasteurización de la leche empleada en la elaboración de los productos derivados de ella, pero no iguala en exactitud al método cuantitativo de Sanders y Sager.
2. El problema con el método colorimétrico Pasterindex consiste en que los resultados considerados como bien pasteurizados y medianamente pasteurizados, muestran en ocasiones resultados erróneos, ya que el 29% de los resultados considerados con el método colorimétrico Pasterindex como medianamente pasteurizados, al comparar con el método cuantitativo de Sanders y Sager, resultaron bien pasteurizados.
3. De acuerdo a la escala de colores del método Pasterindex, al hacer la comparación visual de los resultados cualitativos obtenidos, no siempre los colores coinciden con los de la tabla, sobre todo en los casos considerados como bien pasteurizados y medianamente pasteurizados, de donde se sugiere que en estos casos es necesario realizar además de la prueba cualitativa, una prueba cuantitativa en ug de fenol por gramo de muestra.
4. Es muy importante para obtener determinaciones más exactas con el método cualitativo Pasterindex, incubar la muestra por lo menos durante una hora, ya que con menor tiempo de incubación los colores obtenidos coinciden menos con los de la escala de colores.

B I B L I O G R A F I A

1. Alfa - Laval Cheesemaking Lines (Manual) - 1969.
2. AOAC (Association Official Chemistries Agriculture) (Manual de Métodos de Análisis) 12a. Edición Washington, D.C. - 1975
3. Callis J. J., Hyde J. L., Blackwell J. H., Cunliffe H. R. - Report No. 802 Office International des Epizooties, Paris, Francia - Survival of Foot and Mouth Disease Virus in Milk Products. - 1975.
4. Colorimetric Analysis with the AC Model Fisher Electrophotometer (Manual) - Published by Fisher Scientific Company - 1952.
5. Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa - Informes sobre Enfermedades Animales Procedentes del Exterior - Enero-Febrero 1975.
6. Dirección General de Sanidad Animal - Programa de Emergencia contra Brotes de Enfermedades Exóticas - 1975.
7. Dyer John R. - Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción en Compuestos Orgánicos - P.H.I. Editorial Prentice Hall Internacional - 1973.
8. Eddelman, T. L. y Babel F. J. - Phosphatase Reactivation in Dairy Products - Milk and Food Tech. Vol 21, No. 5 - 1957.
9. Galitzine Catherine - Corona de la Gastronomía Francesa - Selecciones del Reader's Digest (86) - Septiembre 1977.
10. Gastelum Peralta J. R. - Incidencia de Bacterias Coliformes en Leche Pasteurizada para el Consumo en el D.F., proveniente de la Cuenca Lechera del Valle de México - Tesis-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Nacional Autónoma de México - México, D.F. - 1974.
11. Hershenson H. M. - Ultraviolet and Visible Spectra - Index for 1955-1959 - New York Academic Press - 1961.
12. Hyde J. L., Blackwell J. H., Callis J. J. - Efectos de la Pasteurización y Evaporación sobre el Virus de la Fiebre Aftosa contenido en Leche Integra de Vacas Infectadas - Centro de Enfermedades de los Animales de Plum Island, Región Noreste - Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, (USDA), Greenport, N. Y. 11944 - 1975.
13. Hyde J. L., Blackwell J. H., Callis J. J. - La Inactivación por Calor del Virus de Fiebre Aftosa que se Encuentra Presente en la Leche de Vacas Infectadas con Dicha Enfermedad - Centro de Enfermedades de los Animales de Plum Island - Servicio de Investigación Agropecuaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos - Greenport, N.Y. - 1974

14. Kasson S. Gibson - Spectrophotometry, (200 to 1000 Millicrons) - United States Department of Commerce - National Bureau of Standards - Circular No. 484 - 1944.
15. Lerche Martin - Inspección Veterinaria de la Leche. - Zaragoza - *Editorial Acribia* - 1969.
16. Nikitin E.E., Vladimirov A.G. - Supervivencia de los Virus en Leche en Polvo y el Albúmina (alimento) Pulverizada - Instituto de Investigación de la Fiebre Afetosa de la Unión Soviética - 1965.
17. Orozco D. Fernando - Análisis Químico-Cuantitativo - *Imprenta Universitaria* - México, D.F. - 1944
18. Ramírez Aceituno Julio César - La Prueba de la Fosfatasa como Medio para Investigar la Pasteurización en los Quesos Comerciales - Tesis - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Nacional Autónoma de México - México, D.F. - 1958.
19. Ramos Córdoba Mario - Leche, su Producción Higiénica y Control Sanitario - Segunda Edición - 1969.
20. Reference Manual - Foreign Animal Disease Courses - Plum Island Animal Disease Center - United States Department of Agriculture - Greenport, N.Y. - 1975.
21. Ronald V. Diggins, Clarence E. Bundy - Vacas, Leche y sus Derivados - *México Continental* - 1970.
22. Rosell y Dos Santos - Métodos Análíticos de Laboratorio Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácteas. *Editorial Labor, S.A.* - México, D.F. - 1952.
23. Secretaría de Salubridad y Asistencia - Dirección General de Investigación - Boletín Informativo, Vol. III, Nums. 9 y 10 - Mayo 1-30, 1974.
24. Society of Dairy Technology - Manual de Plantas de Pasterización. (Traducción del Inglés por Tarragona Vilas J.M. - Zaragoza - *Acribia* - 1971.
25. Spectronic 20, Spectrophotometer - Operating Manual - Fifth Edition - First Printing - The Baush and Lomb - 1962.
26. Villanueva Zavala Felipe - Proyecto para Manual de Capacitación de Inspectores Zoonosanitarios en Puertos y Fronteras - Dirección General de Sanidad Animal, Departamento de Puertos y Fronteras - México, D.F. - 1973.