



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**"Comprobación de la pasteurización de la leche procesada en el taller de lácteos de la FES - Cuautitlán; por medio de la prueba de fosfatasa alcalina (puntos números 4 y 7 del plan HACCP)"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**Médica Veterinaria Zootecnista**  
P R E S E N T A:  
**ESPERANZA GARCIA LOPEZ**

**Director de Tesis: M. V. Z. JORGE LOPEZ PEREZ**

**Asesor Estadístico: I. C. JUAN R. GARIBAY BERMUDEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS DE  
FALLA DE ORIGEN



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.



INSTITUTO NACIONAL  
AVIARIA Y  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Comprobación de la pasteurización de la leche procesada en el taller de  
leches de la FES-Cuautillan, por medio de la prueba de fosfatos alcalinos  
(punto número 4 y 7 del sistema HACCP)".

que presenta la pasante: García López Esperanza  
con número de cuenta: 8606551 - 9 para obtener el TITULO de:  
Médica Veterinaria Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautillan Izcalli, Edo. de Mex., a 7 de Noviembre de 1996.

PRESIDENTE	<u>MZ. Jaime Keller Torres</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>M. en C. Carlos Martínez Cifuentes</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>MZ. Dra. Luz Patricia Carrillo</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MZ. Rafael Pérez González</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MZ. Raúl Roldán Rodríguez</u>	<u>[Firma]</u>

"Life is just a dream on the way to death".

*City of Angels.*

*The Crow.*

"... el soñar besa la eternidad ..."

*Alas negras*

*Santa Sabina*

Para evitar omitir a alguien, deseo agradecer a todos y cada una de las personas que hicieron posible la realización de esta tesis; en especial a mi director de tesis Jorge López y a mi asesor estadístico Juan Garibay.

**GRACIAS.**

## ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. RESUMEN.	3
2. INTRODUCCIÓN.	4
2.1. COMPONENTES DE LA LECHE.	4
3. MARCO TEÓRICO.	5
3.1. TRATAMIENTO DE LA LECHE. MEDIOS Y MÉTODOS PARA EVALUAR EL CORRECTO TRATAMIENTO TÉRMICO.	5
3.2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.	10
3.3. SISTEMA DE ANÁLISIS DE RIESGO Y CONTROL DE PUNTOS CRÍTICOS (HACCP).	15
4. OBJETIVOS.	24
5. MATERIAL Y MÉTODO.	25
6. RESULTADOS.	30
7. DISCUSIÓN.	42
8. RECOMENDACIONES	45
9. CONCLUSIONES.	46
10. BIBLIOGRAFÍA.	47

## 1. RESUMEN

La leche ha sido considerada como uno de los alimentos más nutritivos pero en ella comúnmente están presentes microorganismos como son *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Listeria spp.*, enterobacterias como *Echerichia coli*, etc.

Para que la leche llegue a su destino final, (al consumidor) en óptimas condiciones, se necesitan establecer requisitos para la calidad. Entre los cuales se tiene la pasteurización, que es capaz (si se mantiene el tiempo y la temperatura requerida) de destruir tanto a bacterias como levaduras, hongos y enzimas propias de la leche, con estas últimas se puede evaluar si el proceso fue correcto. Las enzimas que se utilizan para evaluar la pasteurización son fosfatasa, peroxidasa, amilasa y catalasa. El presente trabajo tomara de referencia solo a la fosfatasa alcalina y a que la leche pasteurizada por cualquier método, deberá dar reacción negativa(47, 48).

Los puntos # 4 y 7 del sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARPC siglas en español y HACCP siglas en ingles) buscan establecer procedimientos para monitorear el control de puntos críticos y los procedimientos de verificación, aplicados en este caso a leche pasteurizada. Un procedimiento de verificación entre otros es la inactivación de la fosfatasa alcalina, la que se hace evidente por colorimetría.

Se obtuvieron 80 muestras del Taller de lácteos de la FES - Cuautitlán durante un lapso de 6 meses: 40 de leche pasteurizada y 40 de leche sin pasteurizar y fueron procesadas utilizando el reactivo de LACTO ZYMA I y II en el Laboratorio de Inspección de Productos de Origen Animal de la misma Facultad.

Se realizó comparación de medias con muestras pareadas; en todas las muestras de leche bronca se detectó actividad de la fosfatasa alcalina mientras que en todas las muestras de leche pasteurizada, la fosfatasa alcalina estaba inactiva.

Se realizaron al mismo tiempo tres pruebas complementarias, pH, temperatura y acidez con las mismas muestras para determinar si éstas afectaron de alguna manera los resultados o el comportamiento de la prueba de fosfatasa alcalina. El análisis estadístico aplicado a los resultados de las tres pruebas antes mencionadas con respecto a la prueba de la fosfatasa indican que estos factores no la afectan.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Composición general de la leche de vaca.

<u>Macrocomponentes</u>	<u>Porcentaje aproximado</u>	<u>Macrocomponentes</u>
Grasa	3.75	Algunos diglicéridos, pero principalmente triglicéridos (C <sub>4</sub> -C <sub>18</sub> , C <sub>18</sub> -1, C <sub>18</sub> -2, C <sub>20</sub> -2 y C <sub>20</sub> -3)
Lípidos	0.05	Lecitina, cefalina, esfingomielinina.
Proteínas	3.38	Caseínas 2.78% α - caseína 1.67% β - caseína 0.62% γ - caseína 0.12% κ - caseína 0.37% Proteínas suero 0.60% α - lactoalbúmina 0.15% β - lactoglobulina 0.35% albúmina sérica 0.04% Trazas otras sustancias nitrogenadas
Lactosa	5.00	Azúcar de la leche
Sales	0.90	Calcio, magnesio, sodio, potasio, fosfatos, cloruros, sulfatos, etc. (Hierro, manganeso, minerales, cobre y cobalto, etc.
Agua	87.0	
	<b>Constituyentes Menores</b>	
Pigmentos	Carotenos, riboflavina, xantofila.	
Enzimas	Lipasas, proteasas, reductasas, fosfatasa, lactoperoxidasa, catalasa, oxidasa, etc.	
Vitaminas	Solubles en grasa A, D, E, K; Solubles en agua C, grupo B.	
Gases	Oxígeno, nitrógeno, CO <sub>2</sub> , amoníaco, etc.	
Volátiles	Volátiles extraños.	
Mat. Celular	Células epiteliales, leucocitos.	
Microrganismos	Bacterias (normales de la leche), contaminantes (ejemplo bacterias, hongos, levaduras).	
Contaminantes	Semillas, pajas, urea, desinfectantes, estiércol, suelo, combustibles, etc.	

(36).



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Tratamiento de la leche. Medios y métodos para evaluar el correcto tratamiento térmico.

Para que la leche llegue a su destino final en óptimas condiciones, se han establecido requisitos para la calidad, prevención de riesgos y/o daños a la salud. A partir de estos requisitos se establecen las medidas higiénicas para obtener, manejar y procesar el producto; así, en los artículos 252 y 271 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, se menciona que es obligatorio someter a la leche para consumo humano a los siguientes procesos: "filtración, enfriamiento, pasteurización, envasado y conservar en refrigeración" y opcionalmente someterla a los procesos de "homogeneización, deodorización, estandarización y descremado" (48). Este trabajo se referirá solo a la pasteurización.

La NOM-019-SSA1-1994., define la pasteurización como "proceso por el cual es sometido el producto a una adecuada relación temperatura y tiempo para destruir la flora bacteriana patógena y casi la totalidad de la flora banal" (47).

"La aplicación de prácticas adecuadas de higiene y sanidad en el manejo de alimentos y bebidas, reduce significativamente el riesgo de intoxicaciones a la población consumidora, lo mismo que las pérdidas del producto, al protegerlo contra contaminaciones contribuyendo a formarle una imagen de calidad y, adicionalmente, evitar al empresario sanciones legales por parte de la autoridad sanitaria" (46)

En la consulta bibliográfica realizada para la presente investigación, diferentes autores proponen temperaturas diversas para llevar a cabo la pasteurización. Los rangos que se manejan son:

- Pasteurización lenta: desde 61°C hasta 65°C por 30 minutos (2, 3, 13, 19, 20, 22, 27, 35, 39, 42).
- Pasteurización rápida de 71 hasta 72°C por 15 a 16 segundos (2, 3, 13, 15, 19, 27, 35, 39, 42, 50).
- Ultrapasteurización de 130 - 150°C por 2-4 segundos (2, 3, 11, 15, 19, 37)

El Reglamento de la Ley General de Salud en su artículo 283 menciona que el proceso de pasteurización deberá realizarse de la siguiente forma (48):

- I. Cada partícula de leche se calienta a una temperatura de 62,5°C sosteniéndose a esta temperatura por un periodo mínimo de 30 minutos (Pasteurización lenta), o
- II. Cada partícula de leche se calienta a una temperatura de 72,2°C y se sostiene a esta temperatura por un periodo mínimo de 15 segundos (Pasteurización rápida) o
- III. Por alguna relación tiempo - temperatura que sea equivalente y que sea autorizada por la Secretaría, y ...", en tanto que la NOM de leche pasteurizada menciona que los productos deben pasteurizarse de la siguiente manera(47):

“Se someterán a una temperatura de 63°C, sosteniéndola por un periodo mínimo de 30 minutos (Pasteurización lenta) o, Se someterán a una temperatura de 72°C, sosteniéndola por un periodo mínimo de 15 segundos (Pasteurización rápida) o, Someterlos a otra relación de tiempo y temperatura cuyo efecto sea equivalente...”

Como se observa en la literatura citada los rangos para tiempo y temperatura varían un poco pero en México se toma como referencia lo que marca el Reglamento de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana para este proceso (pasteurización lenta de 63 °C por 30 minutos y de 72.2°C por 15 seg. pasteurización rápida). No importando si la leche se mantiene líquida como producto final o se elaboren productos a partir de ella, la leche debe someterse al tratamiento térmico (pasteurización) de forma que se destruyan todos los microorganismos patógenos que se encuentren presentes, sin que ninguna de las combinaciones de tiempo - temperatura empleadas, según Van Der Berg (1983), provoque ningún cambio físico o químico (22).

La pasteurización sirve para destruir el 100% de las bacterias patógenas y el 99% de las bacterias saprófitas (2, 3, 42, 50, 52). La destrucción de las bacterias por el calor permite además prolongar el tiempo de conservación de la leche y de los productos elaborados con ella (5, 15, 19) incluso inactiva gran cantidad de enzima que transforman las características de la leche (42).

Para evaluar la correcta pasteurización existen varios métodos; entre ellos se tienen los registros gráficos y los medios químicos. En el primero se grafica tiempo y temperatura del proceso (2, 13, 37, 39) para determinar si éstas son compatibles con los límites establecidos por el Reglamento (48), estos registros deben fecharse y conservarse para inspección regular (2, 13).

El otro método es el químico en el cual, por medio de un reactivo desarrollador de color se evidencia la actividad o inactividad de algunas enzimas que pierden su actividad por acción de la combinación de tiempo-temperatura empleada para la pasteurización. Las enzimas que se utilizan para verificar la pasteurización son: fosfatasa, peroxidasa, amilasa, catalasa (37) y gama glutamato transpeptidasa (30).

En el presente trabajo se tomó de referencia sólo a la fosfatasa alcalina, ya que la leche pasteurizada por cualquier método, deberá dar reacción negativa a la prueba de fosfatasa de acuerdo al Reglamento (48)

Las enzimas son una gran clase de moléculas proteicas que actúan como catalizadores biológicos, interviniendo en todas las reacciones del metabolismo celular (6, 56). La enzima se combina temporalmente con la sustancia sobre la cual actúa (el sustrato) para formar un complejo enzima - sustrato. El complejo se rompe para formar los productos de la reacción y libera la enzima para continuar su reacción. Cada enzima puede catalizar un solo tipo de reacción y es más o menos específica en sus requerimientos de sustrato. Las enzimas se llaman y clasifican de acuerdo con el tipo de reacción y con sus especificidades de sustrato

(6). Éstas se clasifican en 6 grupos diferentes, dependiendo del tipo de reacción que catalicen en: óxido - reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (56). Las hidrolasas son las enzimas que catalizan el desdoblamiento del sustrato con fijación de agua, en este grupo se encuentra la fosfatasa (6), cuya acción es catalizar la hidrólisis de los ésteres fosfóricos(9).

En la leche se distinguen 2 tipos de fosfatasas, estas son la fosfatasa ácida que se encuentra localizada en el lactosuero y la fosfatasa alcalina que se encuentra en la membrana del glóbulo graso (2, 9, 25, 29, 50). La enzima en general se encuentra en pequeña cantidad en la leche de principios de la lactación (3, 9), su mínima concentración se da a los 15 - 25 primeros días después del parto pero la concentración va aumentando y al final de la lactación disminuye y decrece con la edad de la vaca (2, 9). La proporción que se da es de 2,5 a 7,5% de fosfatasa ácida y alcalina respectivamente, pero las enfermedades de la glándula mamaria dan lugar a altas concentraciones en la leche.

#### La fosfatasa ácida:

- Es termoestable (es una de las enzimas más termorresistentes de la leche), se necesita un calentamiento de 5 minutos a 96°C para destruirla completamente
- tiene un pH óptimo a 4.74
- es sensible a los rayos Ultravioleta y a la luz, pero es insensible a los iones metálicos
- se inactiva por el cloruro de sodio.
- muestra una gran actividad sobre la caseína a la que desfosforila, haciéndola más reactiva y oxidable; por otro lado, aumenta su punto isoeléctrico, lo que es importante en los procesos de fabricación basados en la coagulación de la caseína. (29)

#### La fosfatasa alcalina:

- es una fosfomonoestearasa tipo A.
- es termolábil, se consigue la inactivación de un 99% de la fosfatasa a 15.5 minutos a 63°C, en 5.9 segundos a 74°C y en 0.44 segundos a 80°C, lo que permite que cualquier método de pasteurización que se utilice la inactive.
- los iones  $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$  la activan, por el contrario el  $Zn^{++}$ , el  $I^-$  y el  $Be^{++}$  la inactivan y el ácido glutámico, la lisina, los carbohidratos y las sales de amonio la inactivan en un grado variable. Es insensible al fluoruro de sodio.
- tiene un pH óptimo de 9.6.
- de un 30 a un 40% se encuentra localizada en la grasa, adsorbida por los glóbulos grasos y el resto se encuentra en las lipoproteínas. (29).

Existe amplia variación en la actividad de la fosfatasa dentro de las razas bovinas pero esto aun no está claro (10)

Esta enzima tiende a reactivarse después de cierto tiempo de almacenamiento (2, 18, 29, 30, 31), sobre todo si la temperatura es elevada (2) (especialmente en mantequilla); esta reactivación se acelera cuando se mantiene la leche en ausencia de aire, en condiciones reductoras con los tratamientos térmicos, combinaciones de altas temperaturas - corto tiempo y en presencia de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  y por el contrario esta reactivación se retarda con un

enfriamiento instantáneo y con temperaturas muy bajas de almacenamiento; puede incluso evitarse añadiendo cobalto, cobre o níquel, así como por la ausencia de magnesio y de cobalto (29). En la reactivación se cree que esta involucrada la  $\beta$  isomerasa de la enzima asociada con la membrana del glóbulo graso de la leche, pero este mecanismo de reactivación no está completamente entendido (30, 31).

Toda la leche cruda contiene fosfatasa activa, y la resistencia térmica de esta enzima es mayor que la de los patógenos sobre el rango de tiempo y temperatura de los tratamientos térmicos reconocidos para la pasteurización adecuada (2, 5, 9, 43, 54).

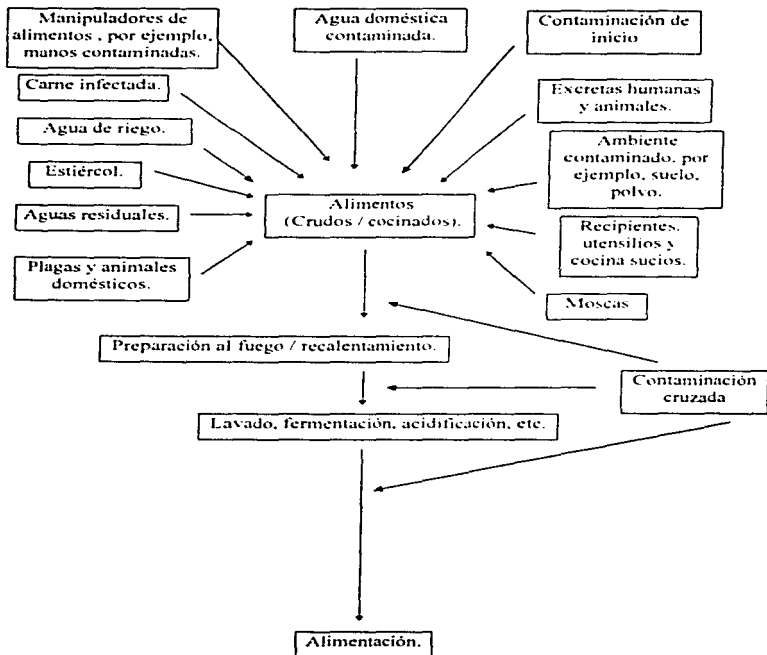
La inactivación de esta enzima de la leche es usada para indicar su correcta pasteurización (2, 3, 5, 9, 10, 12, 18, 20, 24, 25, 29, 30, 31, 35, 43, 48, 52, 54, 55), así como la contaminación de productos pasteurizados con productos crudos que puede ser detectada por esta prueba (54).

La inactivación de las enzimas por calor va asociada con la alteración de la superficie de las moléculas, rompiendo las ligaduras y abriendo anillos en la molécula de la proteína, con disociación y pérdida de la estructura (12).

Después de realizar la pasteurización se debe enfriar la leche a 4°C con la finalidad de evitar que se desarrollen las bacterias que sobrevivieron a este tratamiento (19, 27, 39, 41) además de prolongar la vida de anaquel y llevar al consumidor un producto lácteo inocuo. Con la pasteurización se eliminan también hongos y levaduras presentes en la leche.

"La Federación Internacional de Lechería ha sugerido que un producto comercial como es la leche pasteurizada almacenada, en muy buenas condiciones (refrigerada) se conserva hasta 21 a 28 días" (57); a este periodo de conservación de la leche se le llama vida de anaquel. (41). Sin embargo, puede existir contaminación después de la pasteurización, creando un peligro potencial en la población que la ingiere. Con el objeto de describir las principales fuentes de contaminación de los alimentos, en este caso de la leche, se presenta el Diagrama 1. Con base en él y en investigaciones realizadas, es posible afirmar que "Los brotes de enfermedades de origen alimentario se deben casi siempre a uno o más errores cometidos durante la fase final de preparación de los alimentos" (52).

DIAGRAMA I  
MÚLTIPLES ORÍGENES DE CONTAMINACIÓN



Los microorganismos comúnmente presentes en la leche son *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., enterobacterias como *Echerichia coli*, otras bacterias como *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, etc. (3, 43, 52). Este último microorganismo causante de tuberculosis, es el más resistente al calor de las bacterias que se encuentran comúnmente en leche, y muere al sostener la temperatura a 60 °C durante 20 minutos (35, 39). Como ya se mencionó la fosfatasa alcalina es más difícil de destruir que la mayoría de los microorganismos patógenos presentes (5) por lo tanto, cuando en la muestra de leche se comprueba que esta enzima ha sido inactivada por calentamiento, puede entonces admitirse que al mismo tiempo han quedado destruidos todos los gérmenes patógenos comunes que en ella pudieran existir (43).

### **3.2 Enfermedades transmitidas por alimentos.**

El saneamiento de los alimentos significa "eliminar o controlar en forma efectiva los microorganismos en los alimentos y en todo aquello que entre en contacto con los mismos" (27).

"Los alimentos de origen animal entrañan una amenaza especial para la salud humana, pues su riqueza en proteínas y agua no sólo facilita el rápido deterioro del producto sino también la multiplicación de peligrosos microorganismos patógenos". Se han reportado cifras de agentes patógenos transmitidos por alimentos como 16 clases de bacterias, 5 grupos de virus, 22 parásitos y 5 protozoarios, además de biotoxinas y ciertos residuos químicos aunque la estadística muestra que la mayor cantidad de casos reportados de enfermedades alimentarias son por microorganismos (49).

Los alimentos que se hayan contaminado contribuyen a una elevada incidencia de enfermedades diarreicas (32, 49).

Es importante tomar en cuenta que muchos agentes causales de enfermedades infecciosas en el hombre pueden transmitirse por los alimentos que, con frecuencia son de origen animal (17, 32, 34, 38, 49). Estos alimentos por desgracia no tienen alteraciones visibles en la mayoría de las ocasiones así es que se ingiere la enfermedad sin conocimiento de ello (27, 49).

Entre los gérmenes patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales se han identificado bacterias como *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* 01 y *Campylobacter jejuni*, protozoos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp., también enterovirus como los rotavirus. De igual manera es frecuente la transmisión de patógenos por alimentos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y helmintos; todos ellos pueden causar procesos infecciosos acompañados a menudo de diarrea (32).

Estas enfermedades alimentarias producen en la población afectada altos porcentajes de enfermos (morbilidad) provocando trastornos graves o prolongados, en particular diarreas

agudas, acuosas y/o sanguinolentas (con resultado de deshidratación o ulceración grave), meningitis o enfermedades crónicas de los sistemas renal, articular, cardiovascular, respiratorio o inmunitario (32), e incluso muertos (mortalidad), así como pérdidas económicas tanto por eliminación del alimento como por los recursos médicos gastados y pérdida de horas - hombre.

Además estas afecciones obstaculizan el progreso social y económico de los países, disminuyen la productividad agrícola y el suministro de alimentos, deterioran el estado de nutrición de la población y entorpecen el desarrollo rural (1, 49).

El Dr. G. I. Forbes del Ministerio del Interior de Salud de Escocia (Edimburgo, Reino Unido) ha editado normas publicadas por la OMS sobre organización y administración de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo las encuestas epidemiológicas (el título en inglés de estas normas es "Guidelines for organization and management of surveillance of foodborne diseases") (33).

Estas normas están destinadas a funcionarios y especialistas en sanidad interesados en la prevención y lucha contra las enfermedades transmitidas por alimentos, recogiendo datos sobre epidemiología, etiología e incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos; formulando al mismo tiempo prácticas destinadas a combatir una enfermedad y llevándolas a cabo. Los informes sobre la aparición de las enfermedades contienen la siguiente información: la presencia de patógenos en personas, animales, alimentos y medio ambiente; investigación de brotes y casos esporádicos; ordenación e interpretación de datos reunidos y diseminación de información para facilitar cualquier intervención rápida y eficaz (33).

Las normas de la OMS también incluyen principios para confirmar la presencia de brotes así como métodos para recoger, envasar, conservar y enviar muestras de los alimentos sospechosos.

"El objetivo fundamental del programa de lucha contra las principales zoonosis y enfermedades alimentarias afines de la OMS, es elevar el nivel socioeconómico aumentando la producción alimentaria, mejorando el suministro de proteínas de buena calidad y reduciendo la incidencia y la prevalencia de las zoonosis y enfermedades alimentarias afines de más importancia sanitaria" (1).

Existe además una publicación de la OMS "Microbiological criteria for foods" en la que se resumen las recomendaciones, las razones por las que las adoptaron y las conclusiones formuladas por los expertos y grupos de trabajo de la FAO y la OMS entre 1975 y 1981. Se describen criterios microbiológicos aplicables a diferentes alimentos como productos a base de huevo, leche en polvo, alimentos para lactantes y niños pequeños, helados, aguas minerales naturales entre otros, incluyendo también alimentos crudos (16).

"Los factores que contribuyen a la prevalencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos en la Región de América tienen origen económico, político y sociocultural.

Entre ellos se pueden mencionar los siguientes:

- Ausencia de programas nacionales de protección de los alimentos o falta de continuidad de los existentes.
- Ausencia o ineficiencia de los sistemas nacionales de vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos.
- Falta de legislación actualizada.
- Adiestramiento inadecuado del personal encargado de la protección de los alimentos.
- Infraestructura deficiente para el almacenamiento, transporte y distribución de productos alimentarios.
- Deficiencias en el saneamiento y la urbanización con formación de tugurios sin servicios básicos de agua y alcantarillado.
- Deterioro del nivel socioeconómico de amplios segmentos de la población, con un creciente número de vendedores callejeros de alimentos que no someten sus productos a ningún tipo de control de las autoridades de salud.
- Factores culturales que influyen en la preparación y preservación de los alimentos.
- Información inadecuada a la población en general y a los turistas en particular sobre las medidas para disminuir el riesgo de adquirir una enfermedad transmitida por los alimentos." (34)

La OMS ha estimado que dependiendo del país, entre el 15 y el 79% de los casos de diarrea en menores de 5 años se deben a alimentos contaminados (34).

"El sistema de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por los alimentos es inadecuado en la mayoría de los países. La poca información disponible se conoce con varios años de retraso, por lo cual no es posible la implantación de medidas de control oportunas" (34).

"En los Estados Unidos, el país que posee el mejor sistema de información de la Región, la notificación de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos cubrió solo el 20% de los casos registrados. Con base en estos datos, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estimó que los casos de dichas enfermedades en los Estados Unidos alcanzan los 6.5 millones, lo que probablemente resulta en cerca de 8,000 defunciones. De ese total, se estima que bacterias de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella* son responsables de 2 millones de casos de intoxicación anuales cada uno. El tercer lugar pertenece a *Staphylococcus aureus* (1.5 millones de casos por año) y el cuarto a *Streptococcus* del grupo A (500,000 casos por año). Si se considera que el costo promedio de un tratamiento por cada caso (horas no trabajadas, gastos hospitalarios, gastos médicos y medicamentos, entre otras cosas) alcanzan en los Estados Unidos los \$750 dólares, no es exagerado afirmar que las enfermedades transmitidas por los alimentos son responsables de un gasto anual de alrededor de \$5,000 millones de dólares (americanos)." (34).

Las infecciones por *E. coli* patógeno son probablemente las enfermedades más frecuentes en los países en desarrollo y la causa de hasta 25% de todos los episodios diarreicos (32).



**“Estudios realizados en San Salvador, El Salvador, revelaron una contaminación fecal del 50% en frutas, lácteos, verduras y carnes. *E. Coli* fue identificado como el principal contaminante de los alimentos de venta callejera (83.8%).” (34).**

**“En México las autoridades de Salud determinaron que en 1988 las enfermedades transmitidas por los alimentos fueron responsables por el 23.3% de todas las tasas de morbilidad, y que figuraban entre las 10 principales causas de defunción. En 1989 se registraron en México 18,852 casos de fiebre tifoidea, 93,711 casos de salmonelosis, 113,901 de shigelosis y 48,704 casos de intoxicación alimentaria sin identificación de el agente etiológico.” (34).**

De unas 900 muestras de alimentos y agua de bebida (estudiadas en las zonas rurales de Bangladesh) analizadas para detectar la presencia de coliformes fecales; los alimentos “húmedos” como la leche y el arroz que constituían una considerable porción de la alimentación de destete de los niños de 6 a 23 meses de edad, eran los que contenían más coliformes fecales. Durante la temporada de lluvias, con el aumento de la temperatura ambiental, también aumentó el nivel de contaminación. Estos resultados ponen en relieve que los alimentos estaban contaminados por materia fecal y podían, por lo tanto, ser vehículo de los gérmenes patógenos más a menudo transmitidos por vía fecal u oral, incluidos *Shigella spp.* y *V. cholerae* (32).

En Perú al analizar los productos alimenticios suministrados a los lactantes en el momento de su consumo, se observó que la leche y los alimentos especialmente preparados para los lactantes (cereales o purés) estaban contaminados con mayor frecuencia; mientras que los consumidos por el conjunto de la familia, por ejemplo sopas, estofados y fritos, estaban contaminados menos a menudo. En la mayor parte de los productos alimenticios analizados, la frecuencia de contaminación guardaba relación con el tiempo transcurrido desde la preparación inicial. Entre los gérmenes patógenos hallados en los alimentos había *Salmonella spp.*, *Acromonas hidrófila*, *V. cholerae* no-01 y *E. coli* enterotoxígeno. (32).

Los estudios de análisis de riesgos y determinación de los puntos críticos de control llevados a cabo en unidades familiares de la República Dominicana mostraron que los productos alimenticios cocinados (especialmente frijoles, arroz y leche en polvo) sometidos a condiciones incorrectas de tiempo y temperatura contenían altas cantidades de *B. cereus* y *S. aureus* y coliformes fecales. En Guatemala se detectó una intensa contaminación de tortillas, antes y después de cocinadas (32).

**“Si bien los alimentos industrializados son bastante seguros debido a las medidas de control de calidad adoptadas por la industria organizada, hay que resaltar que estos alimentos también pueden presentar riesgos de transmisión de enfermedades si no se adoptan las buenas prácticas de manufactura correspondientes.” (34).**

**Los agentes patógenos pueden contaminar los alimentos en las distintas materias primas y en diversas etapas de la cadena alimentaria (32).**

Las fuentes potenciales de contaminación de los alimentos son numerosas: contaminación de origen, excretas, agua contaminada, moscas, insectos, animales domésticos, utensilios y recipientes sucios, manos sucias o un entorno contaminado por falta de saneamiento, excrementos de animales domésticos o incluso de vida libre, polvo y suciedad, etc., los propios alimentos crudos o a medio proceso son con frecuencia una fuente de contaminantes pues algunos productos alimenticios albergan en circunstancias naturales agentes patógenos o procedentes de animales infectados (32).

Muchos gérmenes como *V. cholerae*, *Shigella spp.*, *Campylobacter*, *E. coli*, y *Entamoeba histolytica* que causan diarrea en el hombre, se encuentran también en las moscas y muchos de estos gérmenes pueden sobrevivir sobre el regimiento de las moscas hasta 10 días. Estos insectos también pueden albergar en su intestino gérmenes patógenos que depositan en los alimentos al regurgitar o expulsar excrementos. Las moscas son una fuente potencial de contaminación de los alimentos y agua (32).

Tocar los alimentos con las manos contaminadas es la causa de muchos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. En el caso de gérmenes patógenos que presentan una dosis infectiva mínima baja y para las cuales el principal reservorio es el organismo humano (por ejemplo, *Shigella spp.* y *S. typhi*), las manos contaminadas representan un factor de riesgo muy importante. Además de las fuentes mencionadas, otro riesgo posible es la contaminación cruzada durante la manipulación de los alimentos. Puede ocurrir por contacto directo entre los alimentos crudos o cocinados o indirectamente a través de insectos, roedores, manos, superficies o utensilios contaminados (32).

Cualquiera que sea la fuente de contaminación los gérmenes y algunas toxinas que pueden estar presentes en la comida son destruidos por un tratamiento térmico adecuado: la cocción, la pasteurización o el recalentamiento suficiente y a una adecuada temperatura permite reducir su número a niveles inocuos. Sin embargo, la cocción normal no siempre elimina todos los microorganismos (32) y desde luego que muchas toxinas producidas por ellos son termorresistentes.

Muchos alimentos constituyen un buen medio de cultivo de los microorganismos que pueden proliferar y producir toxinas. En condiciones favorables, una sola bacteria puede reproducirse hasta generar 500 millones de bacterias en 10 horas. Teniendo en cuenta que la dosis infectiva mínima de gérmenes patógenos varía de 10 ó menos hasta 10,000 ó 1 millón por gramo o mililitro de alimento, la supervivencia de unos pocos gérmenes en el alimento recién preparado puede representar una amenaza para la salud, sobre todo cuando el alimento se conserva a la temperatura ambiente durante varias horas o toda la noche, como a menudo sucede. Para algunos microorganismos los alimentos cocinados son un medio incluso más favorable que los alimentos crudos, ya que la cocción reduce el número de elementos de la flora competidora. Si el alimento resulta contaminado por ese tipo de microorganismos después de la cocción, por ejemplo a causa de unas manos contaminadas, y se almacena luego a temperaturas inadecuadas durante un periodo prolongado (4 horas), la probabilidad de que sea causa de enfermedades es todavía mayor. Por otra parte, aunque un calentamiento adecuado basta para reducir el número de bacterias, incluidas las

patógenas, hay determinadas toxinas como las producidas por los estafilococos o por determinadas cepas de *B. cereus*, que son termoestables y resisten la cocción (49).

Hay muchas prácticas culinarias y preferencias alimentarias tradicionales que contribuyen a la nocividad de los alimentos. Entre ellas cabe citar la predilección de algunas sociedades por el pescado crudo y las carnes poco cocinadas, el almacenamiento de alimentos perecederos a temperatura ambiente y el descuido de muchos cocineros que no se lavan las manos antes de preparar los alimentos. Todos esos problemas se ven agravados por ciertas creencias culturales y tabúes. En gran parte de América Latina se considera que las manos se "calientan" al entrar en contacto con las planchas y hornos de cerámica o al trabajar con sustancias "calientes" como cal. Se cree también que poner las manos "calientes" en contacto con agua fría provoca calambres y reumatismo, por lo que la gente evita lavárselas, a menudo durante muchas horas. Otra razón importante por la que no se lavan las manos ni se limpian los utensilios correctamente es la escasez de agua (32). Desde luego que también aquí debe considerarse el bajo nivel educativo en relación con la salud que posee la población general en estos países.

### **3.3 Sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos.**

"Durante el último decenio, las enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos se han hecho cada vez más prevalentes en todo el mundo, en parte debido a la gran expansión del comercio nacional e internacional de animales vivos, productos animales y piensos" (49). Tomando en cuenta lo anterior se puede reforzar la vigilancia de todo lo que involucre el proceso del producto y aumentar la seguridad alimentaria y el saneamiento para evitar el paso de enfermedades de un lugar a otro.

La higiene del manejo del producto no solamente depende del equipo utilizado, el personal encargado del proceso y las leyes al respecto sino de una serie de elementos entrelazados que forman una cadena que incluye desde que el animal nace hasta que el producto es ingerido por el consumidor.

El método de Análisis de Riesgo y Control de Puntos críticos (ARPC) surge en la década de los 60 desarrollado en Estados Unidos por la Corporación Pillsbury, la Armada Naval y la Agencia Nacional de Aeronáutica y del Espacio (NASA) del mismo país, tiene como objetivo establecer un método de control preventivo para los alimentos empleados por los programas espaciales y por el ejército (28, 44, 45).

En 1971 en la Primera Conferencia Nacional de Protección de Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica, se presentó con el nombre de "Hazard Analysis and Critical Control Points" (HACCP) (28, 44, 45).

En 1985 el sistema HACCP fue considerado para ser aplicado en la industria de alimentos, en este mismo año la Academia Nacional de Ciencia, lo recomendó (28, 44, 45). La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) además de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) han recomendado e impulsado la implantación y aplicación del método en la elaboración de los alimentos. (28, 44, 45).

Incluso la OPS a partir de la experiencia obtenida en diversos países latinoamericanos ha señalado la importancia de aplicar los principios del HACCP a la venta de alimentos en la vía pública. (4).

El *Codex Alimentarius* ha aplicado este método en el Código de Prácticas para Alimentos Enlatados de Baja Acidez (28, 50, 45).

El método HACCP ayuda a obtener protección máxima al alimento (y por lo tanto a la salud) a un costo mínimo. La inocuidad de los alimentos depende del control adecuado de todas las operaciones relacionadas con estos, desde que se reciben los ingredientes hasta que se distribuyen, venden o consumen los productos tratados o preparados (7, 26, 44, 45).

Los objetivos que busca este sistema son obtener la inocuidad de los alimentos, mejorar la calidad y disminuir las pérdidas al mínimo; con esto se evita la contaminación y se controla el desarrollo de los microorganismos contaminantes limitando su multiplicación o destruyéndolos. (28).

Existen algunas definiciones que deben ser tomadas en cuenta.

**Monitoreo continuo.** Registro ininterrumpido de datos. Por ejemplo el registro gráfico de temperaturas (en proceso).

**Punto de control.** Cualquier punto en un sistema específico de alimento donde la pérdida de control no conduce a un riesgo sanitario inaceptable.

**Punto crítico de control.** Cualquier punto o procedimiento en un sistema de alimento específico en que la pérdida de control puede resultar en un riesgo sanitario inaceptable.

**Defecto crítico.** Un defecto que puede provocar condiciones riesgosas o inseguras para individuos que usen y dependan del producto.

**Límite crítico.** Una o más tolerancias prescritas (parámetros) que deben alcanzarse para asegurar que el control de un punto crítico efectivamente controle un riesgo sanitario microbiológico.

**Desviación.** Falla en alcanzar un límite crítico requerido para el control de un punto crítico.

**Plan HACCP.** El documento escrito que define el procedimiento formal que debe seguirse de acuerdo con estos principios generales.

**Sistema HACCP.** El resultado de la implementación de los principios HACCP.

**Riesgo.** Cualquier propiedad biológica, química o física que puede causar un daño sanitario inaceptable al consumidor.

**Monitoreo.** Una secuencia planeada de observaciones o mediciones de límites críticos diseñada para producir un registro preciso y con la intención de asegurar que los límites críticos mantengan la seguridad del producto.

**Riesgo estadístico.** Un estimado de la probabilidad de ocurrencia de un daño o peligro.

**Categoría de riesgo.** Una de las seis categorías de prioridad de riesgos basada en riesgos de alimentos.

**Ingrediente sensitivo.** Cualquier ingrediente históricamente asociado con un riesgo microbiológico conocido.

**Riesgo significativo.** Postura moderadamente probable de causar un riesgo inaceptable a la salud.

**Chequeo momentáneo.** Pruebas suplementarias realizadas con base en el azar.

**Verificación.** Métodos, procedimientos o pruebas usadas para determinar si el sistema HACCP está de acuerdo al plan HACCP" (26, 28).

El HACCP debe realizarse por separado para cada producto que se elabore en la empresa. La primera etapa consiste en integrar el equipo de trabajo para aplicar el método HACCP. Debe elaborarse el plan HACCP por escrito además de abrir el expediente correspondiente.

Originalmente el sistema HACCP contenía 4 puntos, con el tiempo se anexó 1 más, resultando en la actualidad 7 principios, los cuales se explican brevemente a continuación.

1. Identificar, caracterizar, categorizar y validar los riesgos asociados con el cultivo, cosecha, materia prima e ingredientes, procesamiento, manufactura, distribución, mercadeo, preparación y consumo del alimento. (26, 28, 44, 45).

El primer paso consiste en elaborar una lista de ingredientes que contiene el producto a elaborar, se describe brevemente el producto, identificando que uso se le dará. Además se debe preparar un diagrama de flujo que contemple todas las operaciones del proceso, desde la recepción de la materia prima hasta el consumo del producto *in situ* con el objeto de que refleje lo que en realidad ocurre en esa planta y con ese producto en particular. El diagrama de flujo se realiza en el lugar de proceso en detalle incorporando todas las características del proceso, del trabajo y no debe ser un modelo teórico ya que no correspondería a la realidad.

Se deben identificar para cada proceso, operación e ingrediente si hay riesgo de una contaminación química, física o microbiológica, además de especificar las medidas preventivas para evitar que éstas se presenten.

Una alternativa recomendable es la de emplear como apoyo para esta tarea el árbol de decisiones que aparece en la página 21.

Ya que se identificaron los riesgos o peligros se procede a clasificar el alimento de acuerdo a 6 características que se identifican de la A a la F, si el alimento tiene la característica se usa un signo (+) y un cero (0) si no la tiene. Los alimentos pueden tener más de una letra y de ahí categorizar el riesgo sumando el número de signos (+) que tiene. Las categorías se asignan con números romanos.

#### Característica especial.

*Riesgo A.* Clase especial que se aplica a productos no estériles diseñados y destinados al consumo por poblaciones de alto riesgo, por ejemplo, infantes, ancianos, personas débiles, individuos inmunocomprometidos, guarderías, hospitales, etc.

#### Características generales.

*Riesgo B.* El producto contiene algún ingrediente históricamente asociado con un riesgo microbiológico conocido.

*Riesgo C.* La secuencia del proceso no contiene un paso controlado que destruya efectivamente microorganismos peligrosos.

*Riesgo D.* El producto está sujeto a recontaminación después del procesamiento y antes del empaque.

*Riesgo E.* Existe en el proceso excesivo manipuleo o manejo en la distribución o por el consumidor que puede provocar que el alimento sea peligroso cuando se consume.

*Riesgo F.* No existe un proceso terminal de calentamiento después del empaque o cuando se prepare en el hogar.

Se puede utilizar la siguiente tabla para la caracterización de los riesgos.

ALIMENTO IMPLICADO	CLASE DE RIESGO	CATEGORÍA DE RIESGO
Ingrediente / producto.	A (+) (especial) *	VI
Ingrediente / producto	Cinco (+) (B a F)	V
Ingrediente / producto	Cuatro (+) (B a F)	IV
Ingrediente / producto	Tres (+) (B a F)	III
Ingrediente / producto	Dos (+) (B a F)	II
Ingrediente / producto	Uno (+) (B a F)	I
Ingrediente / producto	Cero (0) (B a F)	0

(26)

\*Categoría VI. Categoría especial que se aplica a productos no estériles diseñados y destinados al consumo por poblaciones de alto riesgo, por ejemplo, infantes, ancianos, personas débiles, individuos inmunocomprometidos, guarderías, hospitales, etc. (29, 31).

2.- Determinar las medidas requeridas para el control de los puntos críticos asociados a los riesgos identificados (26, 28, 44, 45).

Un punto crítico es cualquier procedimiento u operación del proceso que puede controlar la contaminación en el producto (y que pueda ser eficaz y rápidamente monitoreado o corroborado).

Los Puntos Críticos de Control pueden ser localizados en cualquier operación del proceso donde se requiera destruir y/o controlar microorganismos peligrosos y que no pueden aplicarse en otros procesos, por ejemplo la pasteurización de la leche (tratamiento térmico con una combinación de tiempo - temperatura específica) (26, 28, 44, 45).

La Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas de Alimentos (ICMSF) recomendó en 1988 que se establecieran 2 tipos de puntos críticos de control:

Punto Crítico de Control 1 (PCC<sub>1</sub>) donde se efectúa un control completo de un riesgo y, por lo tanto, se elimina el riesgo que existe en esa etapa en particular, por ejemplo, el proceso de pasteurización y esterilización.

Punto Crítico de Control 2 (PCC<sub>2</sub>) donde se lleva a cabo un control parcial, por lo que sólo es posible reducir la magnitud del riesgo, por ejemplo, el almacenamiento frío de leche cruda. (44, 45).

3.- Establecer los límites críticos (parámetros) que deben obtenerse para conocer y controlar cada punto crítico identificado (26, 28, 44, 45).

Los límites son los valores dentro de los cuales debe quedar el proceso, éstos indicarán que con la operación se ha controlado un punto crítico.

Es necesario establecer especificaciones (límites críticos) para cada punto crítico de control. Los criterios que más frecuentemente se utilizan son: temperatura, tiempo, humedad,

dimensiones físicas, nivel de agua libre ( $A_w$ ), pH, acidez titulable, conservadores, concentración de sal, cloruro disponible, viscosidad, textura, aroma, apariencia visual, etc. (26, 28, 44, 45).

4.- Establecer procedimientos para monitorear el control de los puntos críticos (26, 28, 44, 45).

Este principio se basa en la programación de pruebas del control de un punto crítico y sus límites para establecer si un Punto Crítico está realmente controlado. Este monitoreo debe ser extremadamente efectivo ya que una desviación o un error puede tener consecuencias potenciales serias. Las pruebas deben ser rápidas, fáciles, económicas, confiables y continuas. Los resultados del monitoreo deben registrarse y archivarlos en el expediente correspondiente.

Los controles físicos o químicos son los más simples en general ya que los microbiológicos por el tiempo y costo se vuelven imprácticos (11, 28). Para ciertos alimentos o ingredientes no existe alternativa que sustituya la realización de las pruebas microbiológicas, pero se puede establecer la frecuencia de la toma de las muestras (45). Es recomendable el uso de procedimientos estadísticos ya que es un proceso que en ciertas condiciones puede ser predecible analizando los datos obtenidos para inferir si se está controlando el riesgo o si en verdad un paso o ingrediente significa un peligro.

Las pruebas físicas y químicas más empleadas para el monitoreo son temperatura, tiempo, pH, inspección del lugar, contaminación del aire, equipo, sanitización del medio ambiente, medidas preventivas específicas para contaminación cruzada, humedad relativa, etc. (26, 28, 44, 45).

El proceso de control estadístico puede ser aplicado para entender variaciones en el sistema (26, 28).

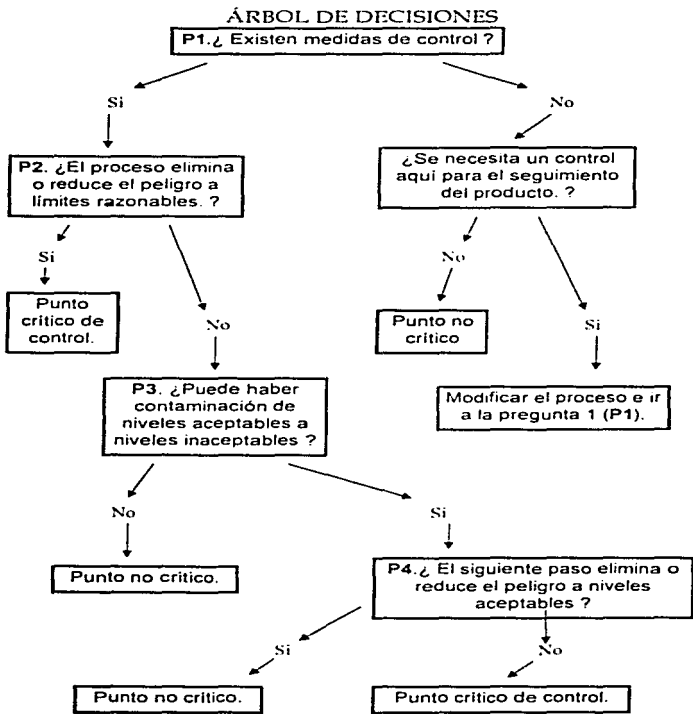
5.- Establecer acciones correctivas que deben ser tomadas cuando el monitoreo indica que hay una desviación en un punto crítico de control (26, 28, 44, 45).

Las acciones correctivas deberán ponerse por escrito e integrarse al plan HACCP (28). Debe determinar el destino de un producto rechazado, corregir la causa del rechazo para asegurar que el punto crítico de control está bajo control y mantener registros de las acciones correctivas, identificar los lotes o productos afectados (28, 44, 45).

6.- Establecer un sistema efectivo de registro y archivo que documente el plan HACCP (26, 44, 45).

En el expediente que contiene el plan HACCP se debe adjuntar toda la documentación relacionada para archivar todo lo que se genere del sistema HACCP. Es necesario tenerlo por escrito para verificar que lo que se incluyó en el plan se está llevando a cabo, actualizándolo, mejorándolo y aumentándolo.





(40).

Algunos ejemplos a utilizar para el registro y archivo de la documentación son los siguientes:

→ **Ingredientes.**

- Certificado de calidad del proveedor.
- Registros de auditorías verificando las especificaciones del proveedor.
- Registros de temperatura de almacenamiento de ingredientes que requieran control de temperatura (por ejemplo refrigeración).
- Registros de almacenamiento de ingredientes con una corta vida de almacén (26, 45).

→ Registros relacionados con la seguridad del producto

- Registros para establecer que las barreras que protegen al producto son eficaces.
- Registros basados en la vida media del producto para establecer la seguridad de la vida de anaquel del mismo.
- Registros del procedimiento y procesamiento remitido y certificado por el personal encargado (26, 45).

→ **Proceso.**

- Registro de todos los Puntos Críticos de Control que han sido monitoreados.
- Registros que ratifiquen que el proceso esté bajo control (26, 45).

→ **Empaque.**

- Registros que manifiesten el cumplimiento con las especificaciones del material del empaque.
- Registros que indiquen el cumplimiento de las determinaciones del sellado.
- Registros que establezcan el cumplimiento de que el producto cuente con la información necesaria para manejo y conservación en el sitio de venta y por el consumidor (26, 45).

→ **Almacenamiento y distribución.**

- Registros de temperatura.
- Registros que indiquen que los productos con fecha de caducidad vencida no fueron embarcados ni distribuidos (26, 45).

→ Registro de desviaciones y acciones correctivas (26, 45)

→ Registros que aseguren la validez de las modificaciones que se han realizado sobre el diseño original del plan HACCP (26,45)

→ Registros del personal que se ha entrenado para la implantación del sistema HACCP. (45).

**7.- Establecer procedimiento para verificar (auditar) que el sistema HACCP está trabajando correctamente. (26, 28, 44, 45).**

La verificación se realiza exhaustivamente y de improviso con la finalidad de determinar si lo que se está llevando a cabo es acorde al diseño original.

La medida de verificación incluye métodos, procedimientos y pruebas físicas, químicas, sensoriales y microbiológicas para que se ratifique que en verdad se logre el aseguramiento del producto y que cumple con el diseño del plan (26, 28, 44, 45). En estas deben participar tanto las dependencias públicas como el productor (26)

En el presente trabajo el monitoreo y la verificación que se llevó a cabo fue la de la pasteurización por medio de la prueba de fosfatasa alcalina que corresponden a los puntos 4 y 7 del plan HACCP respectivamente.

La verificación puede ser conducida de la siguiente manera:

1. Rutinariamente y sin anuncio para asegurar que se tienen bajo control las operaciones designadas como puntos críticos de control.
2. Cuando se conoce nueva información que pueda afectar directamente la seguridad del alimento.
3. Cuando la producción del alimento se ha relacionado con brotes de enfermedades en la población que lo consume.
4. Para verificar que los cambios han sido implantados correctamente después de que el plan HACCP ha sido modificado. (44).

#### 4. OBJETIVOS

##### **Objetivos específicos**

- Efectuar la prueba de la fosfatasa alcalina para confirmar la eficiencia de la pasteurización de la leche procesada en el taller de lácteos de la FES - Cuautitlán.
- Contribuir a la verificación indispensable para el control de un punto crítico (pasteurización).

##### **Objetivo complementario**

- El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación más amplio que trata de establecer el sistema HACCP en la leche procesada de el taller de lácteos de la FES - Cuautitlán.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### Material

- Tubos de ensaye.
- Pipetas de 5 ml.
- Pipetas de 1 ml.
- Vaso de precipitado.
- Gradilla para tubos de ensaye.
- Pipeta volumétrica de 9 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 50 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 150 ml.
- Bureta graduada en 0.1 ml.
- Soporte para bureta.
- Termómetro de bastón, con graduación de 0 a 200°C.
- Frascos de cristal.
- Papel aluminio.
- Cinta adhesiva.
- Cinta testigo para esterilización.
- Leche problema.
- Agua destilada.

### Equipo

- Baño maría.
- Balanza analítica.
- Autoclave.
- Potenciómetro.
- Parrilla eléctrica.

### Reactivos

- ◊ LACTO - ZYMA I  
Reactivo de sodio de fenilfosfato y Buffer alcalino.
- ◊ LACTO - ZYMA II  
Reactivo desarrollador de color.
- ◊ Soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0.
- ◊ Hidróxido de sodio 0.1 N.
- ◊ Indicador de fenoltaleína al 1%.
- ◊ Alcohol etílico (68% y 96%).

### Procedimientos

Toda la leche analizada fue la que se obtuvo el mismo día. Para la prueba de fosfatasas: Se usaron dos tubos: uno con la leyenda problema y otro control; se les añadió a cada uno 10

ml. de agua destilada a 37 - 39°C, se les añadió a cada uno 250 mg. de polvo Laeto-Zyma I y se mezcló homogéneamente

Al tubo problema se le añadió 1 ml. de la leche por analizar y se mezcló. Con el tubo control, se procedió de la misma manera pero con leche caliente en la cual la fosfatasa fue previamente destruida por calentamiento a 85°C., para tener mayor seguridad fue necesario incubar la mezcla de ambos tubos en un baño de agua o en una estufa a 45°C., durante 10 minutos.

Después de agregar 250 mg. de polvo de Laeto-Zyma II a ambos tubos, se dejaron en reposo durante 10 minutos y se agitaron.

Posteriormente a los 3 o 5 minutos se compararon los colores de los dos tubos con la tabla de colores referida por el fabricante del reactivo.

Las medidas de seguridad utilizadas fueron las siguientes: evitar el contacto de la mezcla anterior con saliva, sudor, y elementos de plástico; ya que estas contienen fosfatasa e intervendrían con el resultado de la prueba

La determinación de la acidez: Medir 9 ml. con la pipeta y colocarlos en un Matraz Erlenmeyer, se añaden 3 a 5 gotas de fenofaleína, se agita y se procede a hacer la titulación con NaOH al 0.1 N hasta que aparezca un color rosado, el cual sea perdurable durante 10 a 15 segundos.

Para determinación de pH: Se enciende el potenciómetro media hora antes de hacer la determinación; en el transcurso de este tiempo se calibra con las soluciones buffer. En el vaso de precipitados se colocan 50 ml. de muestra, se toma la temperatura de ésta y se ajusta al compensador del potenciómetro a la muestra y se procede a realizar la lectura.

Para la estabilidad fisicoquímica: En un tubo de ensaye se colocan 5 ml. de leche problema y 5 ml. de alcohol etílico al 68%, se mezclan correctamente los reactivos y se observa el tubo de ensaye a tras luz, o se vacía el contenido del tubo sobre una superficie oscura y se observa si hay o no floculos. Es importante aclarar que en esta prueba la mezcla de leche y alcohol etílico debe ser en proporción 1:1.

### **Método estadístico**

El método de análisis utilizado fue el experimental, es decir, se plantearán hipótesis, que se comprobaron mediante la obtención de valores de las variables correspondientes en las respectivas muestras, con métodos estadísticos inferenciales (21, 23, 51, 53). Se realizó comparación de medias con muestras pareadas

### **Muestreo**

Se utilizó un muestreo aleatorio simple cualitativo. En este muestreo todos los elementos de la población tienen la misma probabilidad de ser elegidos; el objetivo primordial es reducir al mínimo el error (llamado error estándar muestral) con las muestras obtenidas

representativas de la población. Al inferir estadísticamente, se obtendrán valores muy aproximados a los verdaderos de la población (21, 23, 51, 53).

#### **Tipo de estudio**

El tipo de estudio que se utilizó en este trabajo fue experimental transeccional correlacional/causal ya que tienen como objetivo describir relaciones entre dos o más variables en un momento determinado (21, 23, 51, 53).

#### **Variables**

Variables independientes: tiempo y temperatura en pasteurización, acidez, pH y estabilidad fisicoquímica.

Variable dependiente: inactivación de la fosfatasa (21).

#### **Definición de las variables**

**Acidez:** Es cuando se acumulan los protones libres en una sustancia o elemento.(14)

**Actividad de fosfatasa:** Operación o impresión de cualquier agente (fosfatasa) en el producto. En enzimología, la actividad de un enzima referida a los mg de proteína se denomina actividad específica. La unidad más empleada corresponde a la cantidad de enzima necesaria para transformar un umol de sustrato por minuto en condiciones óptimas de acción (54).

**Estabilidad fisicoquímica de la leche:** Es el equilibrio donde se mantienen las propiedades de la leche.(54)

#### **Operacionalización de las variables**

Después de realizada la prueba de fosfatasa alcalina se procederá a comparar el color con la tabla señalada por el fabricante.

Por la prueba de titulación se determinará la acidez directa que tiene la leche.

Por medio de el potenciómetro se obtendrá el pH de la leche.

Para la estabilidad fisicoquímica frente al calentamiento de la leche analizada se observa la floculación o no de la muestra.

#### **Tamaño de la muestra**

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizará la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N Z_0 P_0 Q_0}{N e + Z_0 P_0 Q_0}$$

En donde:

N = 120 días

e = 5.2% (error máximo permitido)

Z<sub>0</sub> = 2.575 (valor de tablas en función del nivel de confianza)

1 - α = 99% (nivel de confianza)

P<sub>0</sub> = 0.95 (proporción de favorables).

Q<sub>0</sub> = 0.05 (proporción de no favorables).

nd = tamaño de muestra definitiva.

no = tamaño de muestra previa.

$$n = \frac{120 (2.575) (0.95) (0.05)}{120 (0.052) + (2.575) (0.95) (0.05)} = 59.11 = 60$$

$$n = 60$$

$$nd = \frac{no}{1 + \frac{no}{N}}$$

$$nd = \frac{60}{1 + \frac{60}{120}}$$

$$nd = 40$$

### Hipótesis

H<sub>1</sub>: Al no realizar una buena pasteurización de la leche procesada en el taller de lácteos entonces no se eliminará el riesgo.

H<sub>01</sub>: Al realizar una buena pasteurización de la leche procesada en el taller de lácteos entonces se eliminará el riesgo.

H<sub>2</sub>: Existe relación entre los datos obtenidos de la prueba de acidez y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización.

H<sub>02</sub>: No existe relación entre los datos obtenidos de la prueba de acidez y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización.



**H<sub>3</sub>:** Existe relación entre los datos obtenidos de la prueba de pH y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización.

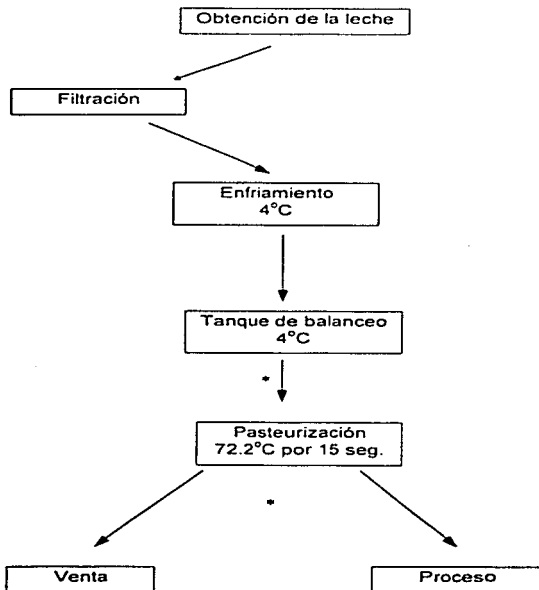
**H<sub>03</sub>:** No existe relación entre los datos obtenidos de la prueba de pH y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización.

**H<sub>4</sub>:** Existe relación entre los datos obtenidos de la prueba de estabilidad fisicoquímica y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización.

**H<sub>04</sub>:** No existe relación entre los datos obtenidos de la prueba de estabilidad fisicoquímica y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización.

## 6. RESULTADOS

Como se mencionó en el marco teórico se debe realizar un diagrama de bloques para cada alimento, el de la leche procesada en el taller de lácteos de la FES - Cuautitlán es el siguiente:



- momento en el cual se tomaron las muestras para este estudio

Los resultados se presentan por medio de tablas, las primeras dos, presentan los datos de: fecha de colecta, número de muestra, alcohol al 68% y al 96%, pH, temperatura, acidez y fosfatasa alcalina. Así, en la tabla número 1 se muestran los datos de la leche sin pasteurizar y en la 2 los de leche pasteurizada.

En la tabla 3 (página 34) se presentan los resultados de fosfatasa alcalina; al igual que la anterior se presentan la fecha, el número de muestra, resultado con leche antes de pasteurizar y leche pasteurizada. El tratamiento estadístico que se aplicó se desarrolla en la página 41.

El pH se encuentra en la tabla número 4 (página 36). Contiene fecha, número de muestra, resultado de la muestra pasteurizada, resultado de la muestra sin pasteurizar y el tratamiento estadístico empleado.

La tabla 5 (página 38) muestra los resultados obtenidos de la acidez titulable. Al igual que en la anterior contiene fecha, número de muestra, resultado de la muestra pasteurizada, resultado de la muestra sin pasteurizar y su tratamiento estadístico.

La tabla 6 (página 40) es la de la estabilidad de la leche al calentamiento mediante la prueba del alcohol al 68%, mostrándose fecha, número de muestra y resultado de la prueba.

Se realizó comparación de medias con muestras pareadas, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

El 100% de las muestras resultaron negativas a la fosfatasa alcalina

Los valores de la prueba de pH de la leche de esta investigación van de 6.50 a 6.70, el valor medio de las dos observaciones es de 6.628125 y la desviación estándar de la leche pasteurizada es de  $\pm 0.04055307$  y la desviación de la leche sin pasteurizar de  $\pm 0.03748404$

Todos los valores de la prueba de acidez fluctuaron entre 1.5 y 1.9, el valor medio de las dos observaciones es de 1.6575 y la desviación estándar de la leche pasteurizada es de  $\pm 0.09026315$  y la desviación estándar de la leche sin pasteurizar de  $\pm 0.09841696$ .

El 100% de las muestras resultaron negativas a la prueba de alcohol al 68%.

**TABLA #1:**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS A LA LECHE SIN**  
**PASTEURIZAR**

Fecha	# de muestra	Estabilidad al alcohol al 68%	Acidez titulable	pH	Fosfatasa alcalina
17/04/95	1	Negativo	1.7	6.64	Positivo
20/04/95	2	Negativo	1.8	6.66	Positivo
25/04/95	3	Negativo	1.9	6.66	Positivo
28/04/95	4	Negativo	1.9	6.70	Positivo
3/05/95	5	Negativo	1.7	6.65	Positivo
8/05/95	6	Negativo	1.9	6.68	Positivo
11/05/95	7	Negativo	1.8	6.62	Positivo
16/05/95	8	Negativo	1.7	6.65	Positivo
19/05/95	9	Negativo	1.7	6.70	Positivo
24/05/95	10	Negativo	1.7	6.63	Positivo
29/05/95	11	Negativo	1.6	6.66	Positivo
1/06/95	12	Negativo	1.7	6.67	Positivo
6/06/95	13	Negativo	1.5	6.66	Positivo
9/06/95	14	Negativo	1.6	6.64	Positivo
14/06/95	15	Negativo	1.7	6.65	Positivo
19/06/95	16	Negativo	1.7	6.61	Positivo
22/06/95	17	Negativo	1.6	6.59	Positivo
27/06/95	18	Negativo	1.6	6.64	Positivo
30/06/95	19	Negativo	1.7	6.64	Positivo
5/07/95	20	Negativo	1.6	6.63	Positivo
10/07/95	21	Negativo	1.6	6.65	Positivo
13/07/95	22	Negativo	1.6	6.64	Positivo
18/07/95	23	Negativo	1.6	6.61	Positivo
21/07/95	24	Negativo	1.6	6.60	Positivo
26/07/95	25	Negativo	1.6	6.63	Positivo
31/07/95	26	Negativo	1.6	6.64	Positivo
3/08/95	27	Negativo	1.6	6.60	Positivo
8/08/95	28	Negativo	1.6	6.64	Positivo
11/08/95	29	Negativo	1.7	6.65	Positivo
16/08/95	30	Negativo	1.7	6.64	Positivo
21/08/95	31	Negativo	1.5	6.67	Positivo
24/08/95	32	Negativo	1.6	6.61	Positivo
29/08/95	33	Negativo	1.7	6.60	Positivo
1/09/95	34	Negativo	1.6	6.61	Positivo
6/09/95	35	Negativo	1.7	6.53	Positivo
11/09/95	36	Negativo	1.6	6.54	Positivo
14/09/95	37	Negativo	1.5	6.57	Positivo
19/09/95	38	Negativo	1.6	6.57	Positivo
22/09/95	39	Negativo	1.6	6.63	Positivo
27/09/95	40	Negativo	1.6	6.59	Positivo

Fuente: García, L. E./ 1996.

**TABLA #2:****RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS A LA LECHE  
PASTEURIZADA**

Fecha	# de muestra	Acidez titulable	pH	Fosfatasa alcalina
17/04/95	1	1.8	6.64	Negativo
20/04/95	2	1.8	6.64	Negativo
25/04/95	3	1.9	6.67	Negativo
28/04/95	4	1.9	6.70	Negativo
3/05/95	5	1.7	6.64	Negativo
8/05/95	6	1.8	6.67	Negativo
11/05/95	7	1.8	6.62	Negativo
16/05/95	8	1.7	6.67	Negativo
19/05/95	9	1.7	6.70	Negativo
24/05/95	10	1.7	6.63	Negativo
29/05/95	11	1.6	6.65	Negativo
1/06/95	12	1.7	6.67	Negativo
6/06/95	13	1.6	6.64	Negativo
9/06/95	14	1.6	6.64	Negativo
14/06/95	15	1.6	6.67	Negativo
19/06/95	16	1.7	6.61	Negativo
22/06/95	17	1.6	6.59	Negativo
27/06/95	18	1.6	6.64	Negativo
30/06/95	19	1.7	6.64	Negativo
5/07/95	20	1.6	6.61	Negativo
10/07/95	21	1.6	6.64	Negativo
13/07/95	22	1.6	6.64	Negativo
18/07/95	23	1.6	6.61	Negativo
21/07/95	24	1.6	6.60	Negativo
26/07/95	25	1.6	6.62	Negativo
31/07/95	26	1.6	6.64	Negativo
3/08/95	27	1.6	6.60	Negativo
8/08/95	28	1.6	6.64	Negativo
11/08/95	29	1.6	6.63	Negativo
16/08/95	30	1.6	6.65	Negativo
21/08/95	31	1.6	6.62	Negativo
24/08/95	32	1.7	6.61	Negativo
29/08/95	33	1.7	6.56	Negativo
1/09/95	34	1.5	6.60	Negativo
6/09/95	35	1.7	6.53	Negativo
11/09/95	36	1.6	6.65	Negativo
14/09/95	37	1.6	6.56	Negativo
19/09/95	38	1.6	6.50	Negativo
22/09/95	39	1.6	6.62	Negativo
27/09/95	40	1.6	6.59	Negativo

Fuente : García, L. E. / 1996.

**TABLA #3:**

**RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DE FOSFATASA ALCALINA**

Fecha	# de muestra	Sin pasteurizar	Pasteurizada
17/04/95	1	Positivo	Negativo
20/04/95	2	Positivo	Negativo
25/04/95	3	Positivo	Negativo
28/04/95	4	Positivo	Negativo
3/05/95	5	Positivo	Negativo
8/05/95	6	Positivo	Negativo
11/05/95	7	Positivo	Negativo
16/05/95	8	Positivo	Negativo
19/05/95	9	Positivo	Negativo
24/05/95	10	Positivo	Negativo
29/05/95	11	Positivo	Negativo
1/06/95	12	Positivo	Negativo
6/06/95	13	Positivo	Negativo
9/06/95	14	Positivo	Negativo
14/06/95	15	Positivo	Negativo
19/06/95	16	Positivo	Negativo
22/06/95	17	Positivo	Negativo
27/06/95	18	Positivo	Negativo
30/06/95	19	Positivo	Negativo
5/07/95	20	Positivo	Negativo
10/07/95	21	Positivo	Negativo
13/07/95	22	Positivo	Negativo
18/07/95	23	Positivo	Negativo
21/07/95	24	Positivo	Negativo
26/07/95	25	Positivo	Negativo
31/07/95	26	Positivo	Negativo
3/08/95	27	Positivo	Negativo
8/08/95	28	Positivo	Negativo
11/08/95	29	Positivo	Negativo
16/08/95	30	Positivo	Negativo
21/08/95	31	Positivo	Negativo
24/08/95	32	Positivo	Negativo
29/08/95	33	Positivo	Negativo
1/09/95	34	Positivo	Negativo
6/09/95	35	Positivo	Negativo
11/09/95	36	Positivo	Negativo
14/09/95	37	Positivo	Negativo
19/09/95	38	Positivo	Negativo
22/09/95	39	Positivo	Negativo
27/09/95	40	Positivo	Negativo

Fuente : Garcia L. E. /1996.

LOTE DE LECHE  
PASTEURIZADA

$$bc = 40$$

$$pc = bc/nc = 40/40 = 1$$

$$nc = 40$$

LOTE DE LECHE SIN  
PASTEURIZAR

$$ns = 40$$

$$ps = bs/ns = 40/40 = 1$$

$$bs = 40$$

$$pc - ps = 1 - 1 = 0$$

$$H_0: P_c = P_s (P_c - P_s = 0)$$

$$H_1: P_c \neq P_s (P_c - P_s \neq 0)$$

En donde:

nc = Tamaño de muestra de la leche pasteurizada.

bc = Número de éxitos en la muestra pasteurizada.

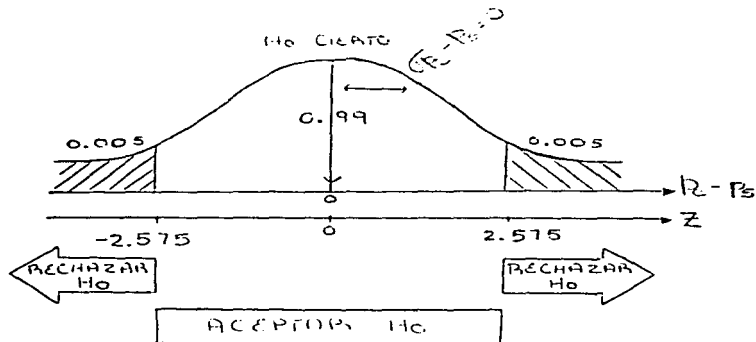
pc = La proporción de éxitos en la muestra pasteurizada.

ns = Tamaño de la muestra de la leche sin pasteurizar.

bs = Número de éxitos en la muestra sin pasteurizar.

ps = La proporción de la éxitos en la muestra sin pasteurizar.

pc - ps = Diferencia de proporciones muestrales de éxitos.



**TABLA #4: RESULTADOS OBTENIDOS DE LA DETERMINACIÓN DEL pH**

Fecha	# de muestra	Pasteurizada	Sin pasteurizar	d	d <sup>2</sup>
17/04/95	1	6.64	6.64	0	0
20/04/95	2	6.64	6.66	-0.02	0.0004
25/04/95	3	6.67	6.66	0.01	0.0001
28/04/95	4	6.70	6.70	0	0
3/05/95	5	6.64	6.65	-0.01	0.0001
8/05/95	6	6.67	6.68	-0.01	0.0001
11/05/95	7	6.62	6.62	0	0
16/05/95	8	6.67	6.65	0.02	0.0004
19/05/95	9	6.70	6.70	0	0
24/05/95	10	6.63	6.63	0	0
29/05/95	11	6.65	6.66	-0.01	0.0001
1/06/95	12	6.67	6.67	0	0
6/06/95	13	6.64	6.66	-0.02	0.0004
9/06/95	14	6.64	6.64	0	0
14/06/95	15	6.67	6.65	0.02	0.0004
19/06/95	16	6.61	6.61	0	0
22/06/95	17	6.59	6.59	0	0
27/06/95	18	6.64	6.64	0	0
30/06/95	19	6.64	6.64	0	0
5/07/95	20	6.61	6.63	-0.02	0.0004
10/07/95	21	6.64	6.65	-0.01	0.0001
13/07/95	22	6.64	6.64	0	0
18/07/95	23	6.61	6.61	0	0
21/07/95	24	6.60	6.60	0	0
26/07/95	25	6.62	6.63	-0.01	0.0001
31/07/95	26	6.64	6.64	0	0
3/08/95	27	6.60	6.60	0	0
8/08/95	28	6.64	6.64	0	0
11/08/95	29	6.63	6.65	-0.02	0.0004
16/08/95	30	6.65	6.64	0.01	0.0001
21/08/95	31	6.62	6.67	-0.05	0.0025
24/08/95	32	6.61	6.61	0	0
29/08/95	33	6.56	6.60	-0.04	0.0016
1/09/95	34	6.60	6.61	-0.01	0.0001
6/09/95	35	6.53	6.53	0	0
11/09/95	36	6.65	6.54	0.01	0.0001
14/09/95	37	6.56	6.57	-0.01	0.0001
19/09/95	38	6.50	6.57	0.07	0.0049
22/09/95	39	6.62	6.63	-0.01	0.0001
27/09/95	40	6.59	6.59	0	0
				-0.25	0.0125

Fuente : García, L. E. / 1996.



$H_0 : \mu d = 0$  (CP = SP)

$H_1 : \mu d \neq 0$  (CP  $\neq$  SP)

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{n} = \frac{-0.25}{40} = -0.00625$$

$$S\bar{d} = \frac{Sd}{\sqrt{n}} = \frac{0.01675}{\sqrt{40}} = 0.002648$$

$$Z_c = \frac{\bar{d} - 0}{S\bar{d}} = \frac{-0.00625 - 0}{0.002648} = -2.360 \text{ (ns)}$$

Como  $-2.360 > -2.575$

Se acepta  $H_0$ . No hay diferencia.

CP = SP

En donde:

$\mu d$  = El promedio poblacional de todas las diferencias de cada lote.

CP = Leche con pasteurización.

SP = Leche sin pasteurización.

$d$  = Diferencia en cada lote.

$\sum d$  = Sumatoria de la diferencia de cada lote.

$\bar{d}$  = Promedio de las diferencias de cada lote.

$Sd$  = Diferencia estándar de las diferencias de cada lote.

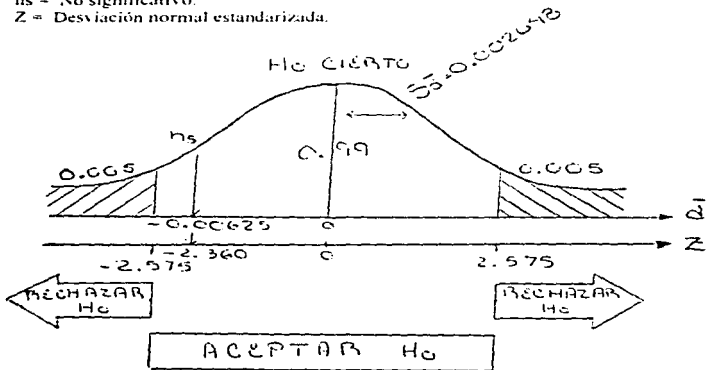
$S\bar{d}$  = Error estándar muestral.

$Z_c$  = Zeta calculada.

$n$  = Número de muestras.

ns = No significativo.

$Z$  = Desviación normal estandarizada.



**TABLA #5:  
RESULTADOS OBTENIDOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE**

Fecha	# de muestra	Pasteurizada	Sin Pasteurizar	d	d <sup>2</sup>
17/04/95	1	1.8	1.7	0.1	0.01
20/04/95	2	1.8	1.8	0	0
25/04/95	3	1.9	1.9	0	0
28/04/95	4	1.9	1.9	0	0
3/05/95	5	1.7	1.7	0	0
8/05/95	6	1.8	1.9	-0.1	0.01
11/05/95	7	1.8	1.8	0	0
16/05/95	8	1.7	1.7	0	0
19/05/95	9	1.7	1.7	0	0
24/05/95	10	1.7	1.7	0	0
29/05/95	11	1.6	1.6	0	0
1/06/95	12	1.7	1.7	0	0
6/06/95	13	1.6	1.5	0.1	0.01
9/06/95	14	1.6	1.6	0	0
14/06/95	15	1.6	1.7	-0.1	0.01
19/06/95	16	1.7	1.7	0	0
22/06/95	17	1.6	1.6	0	0
27/06/95	18	1.6	1.6	0	0
30/06/95	19	1.7	1.7	0	0
5/07/95	20	1.6	1.6	0	0
10/07/95	21	1.6	1.6	0	0
13/07/95	22	1.6	1.6	0	0
18/07/95	23	1.6	1.6	0	0
21/07/95	24	1.6	1.6	0	0
26/07/95	25	1.6	1.6	0	0
31/07/95	26	1.6	1.6	0	0
3/08/95	27	1.6	1.6	0	0
8/08/95	28	1.6	1.6	0	0
11/08/95	29	1.6	1.7	-0.1	0.01
16/08/95	30	1.6	1.7	-0.1	0.01
21/08/95	31	1.6	1.5	0.1	0.01
24/08/95	32	1.7	1.6	0.1	0.01
29/08/95	33	1.7	1.7	0	0
1/09/95	34	1.5	1.6	-0.1	0.01
6/09/95	35	1.7	1.7	0	0
11/09/95	36	1.6	1.6	0	0
14/09/95	37	1.6	1.5	0.1	0.01
19/09/95	38	1.6	1.6	0	0
22/09/95	39	1.6	1.6	0	0
27/09/95	40	1.6	1.6	0	0
				0	0.10

Fuente : García, L. E. / 1996.

$H_0: \mu d = 0$  (No hay diferencia)

$H_1: \mu d \neq 0$  (Si hay diferencia)

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{n} = \frac{0}{40} = 0$$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - (\sum d)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.10 - (0)^2}{39}} = 0.05064$$

$$S_{\bar{d}} = \frac{S_d}{\sqrt{n}} = \frac{0.05064}{\sqrt{40}} = 0.008006$$

$$Z_c = \frac{\bar{d} - 0}{S_{\bar{d}}} = \frac{0 - 0}{0.008006} = 0 \text{ (ns)}$$

Como  $Z_c = 0$

Se acepta  $H_0$

CP = SP

En donde:

$\mu d$  = El promedio poblacional de todas las diferencias de cada lote.

CP = Leche con pasteurización.

SP = Leche sin pasteurización.

$d$  = Diferencia en cada lote.

$\sum d$  = Sumatoria de la diferencia de cada lote.

$\bar{d}$  = Promedio de las diferencias de cada lote.

$S_d$  = Diferencia estándar de las diferencias de cada lote.

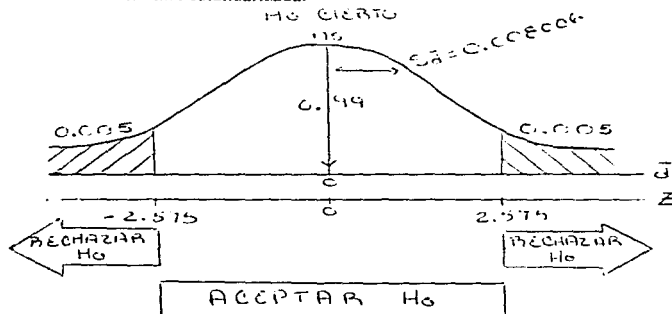
$S_{\bar{d}}$  = Error estándar muestral.

$Z_c$  = Zeta calculada.

$n$  = Número de muestras.

ns = No significativo.

$Z$  = Desviación normal estandarizada.



**TABLA #:6:**

**RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS DE ALCOHOL AL 68%.**

Fecha	# de muestra	Estabilidad al 68%
17/04/95	1	Negativo
20/04/95	2	Negativo
25/04/95	3	Negativo
28/04/95	4	Negativo
3/05/95	5	Negativo
8/05/95	6	Negativo
11/05/95	7	Negativo
16/05/95	8	Negativo
19/05/95	9	Negativo
24/05/95	10	Negativo
29/05/95	11	Negativo
1/06/95	12	Negativo
6/06/95	13	Negativo
9/06/95	14	Negativo
14/06/95	15	Negativo
19/06/95	16	Negativo
22/06/95	17	Negativo
27/06/95	18	Negativo
30/06/95	19	Negativo
5/07/95	20	Negativo
10/07/95	21	Negativo
13/07/95	22	Negativo
18/07/95	23	Negativo
21/07/95	24	Negativo
26/07/95	25	Negativo
31/07/95	26	Negativo
3/08/95	27	Negativo
8/08/95	28	Negativo
11/08/95	29	Negativo
16/08/95	30	Negativo
21/08/95	31	Negativo
24/08/95	32	Negativo
29/08/95	33	Negativo
1/09/95	34	Negativo
6/09/95	35	Negativo
11/09/95	36	Negativo
14/09/95	37	Negativo
19/09/95	38	Negativo
22/09/95	39	Negativo
27/09/95	40	Negativo

Fuente : Garcia, L. E. / 1996.

Prueba de alcohol al 68%

$$n_1 = 40$$

$$pc = \frac{b_1}{n_1} = \frac{40}{40} = 1$$

$$b_1 = 40$$

## 7. DISCUSIÓN

Al verificar y/o monitorear la pasteurización de la leche procesada en el taller de lácteos de la FES - Cuautitlán por medio de la prueba fosfatasa alcalina, se encontró que esta enzima no fue evidente, es decir, el 100% de las muestras resultaron negativas a la prueba (no se detectó actividad de esta enzima), demostrando con esto la eficiencia de la pasteurización.

Existen varias pruebas para comprobar la eficiencia de la pasteurización, estas trabajan con base en la determinación de la actividad de enzimas que se inactivan con altas temperaturas tales como las de pasteurización, como se ha descrito en el marco teórico, entre las cuales tenemos a la peroxidasa, amilasa, fosfatasa alcalina, catalasa y gema glutamato transportadas. Se seleccionó la prueba de fosfatasa alcalina por que se tienen antecedentes de que esta prueba es efectiva para este fin, como se plantea en el boletín de la Federación Internacional de lechería en el que se menciona que la prueba de fosfatasa alcalina fue desarrollada en 1935 (8), además, porque la legislación mexicana establece que la prueba de fosfatasa alcalina debe realizarse para comprobar la pasteurización y que su resultado debe ser negativo.

McKellar et al. mencionan que este método es sensitivo como para detectar una cantidad tan pequeña como 0.1% de fosfatasa alcalina activa (31). Se conocen otros métodos que detectan concentraciones menores, los cuales son el método AOAC o los métodos de Asehatienburg y Mullen modificado y estándar detectando hasta 0.2% y el método Flourphos que utiliza fluorometría que detecta concentraciones de 0.006% de fosfatasa alcalina (37).

Estos métodos no son muy factibles de realizar como pruebas de rutina puesto que no existe el equipo necesario para llevar a cabo la prueba en la mayoría de los laboratorios de México o el personal no se encuentra debidamente capacitado para utilizar los aparatos o interpretar los resultados como procedimiento para empleo constante.

Existen diversas marcas comerciales de reactivos en México para realizar la prueba de la fosfatasa alcalina, así mismo es posible preparar el reactivo en el laboratorio. De estas opciones se seleccionó el reactivo I.acto - Zyma por que ya se contaba con él, además de que la prueba es sencilla de realizar, barata y los resultados obtenidos son fáciles de interpretar y confiables.

Para comparar el resultado de la prueba de fosfatasa realizada en el estudio, se buscó en la bibliografía sin encontrar estudios similares al presente; por ello se comparará contra un estudio realizado por Piñón (37).

Piñón utilizó en su trabajo el mismo reactivo para confirmar la pasteurización de cremas sin marca. En su investigación se reporta que las variaciones encontradas entre los resultados obtenidos no se deben al azar, sino a que no se encuentran pasteurizadas o bien por haberse contaminado con leche o crema sin pasteurizar, él encontró en este estudio que podía confiarse más en las cremas con marca que en las que no tenían marca y que se

venden a granel en tianguis y mercados establecidos. Tales resultados permiten suponer que el consumo de esta crema sin marca puede causar un daño sanitario inaceptable al consumidor.

Esto indica que las cremas sin marca muestran deficiencias en su proceso de elaboración en contraposición con las cremas elaboradas de manera industrial que sí se procesan adecuadamente y no presentan riesgo alguno. Tanto en el trabajo de Piñón como en el presente se comprobó la pasteurización por medio de la prueba de fosfatasa alcalina; en ambos casos los resultados obtenidos mostraron que los productos que llevan implícito un proceso industrial como es la pasteurización, eliminan el riesgo; y la prueba al mismo tiempo nos sirve para verificar que el proceso se llevo a cabo satisfactoriamente.

El análisis estadístico aplicado a los resultados de la prueba de acidez con respecto a los resultados de la verificación de la eficiencia de la pasteurización indica que la acidez no ejerce ningún efecto ni negativo ni positivo sobre esta, lo mismo se puede decir de correlacionar los resultados de la prueba de fosfatasa con la de pH y la prueba de alcohol al 68%.

La NOM-091-SSA1-1994 menciona que la leche debe tener una acidez mínima de 1.3 o máxima de 1.7 g/l (47) y el Reglamento menciona que la acidez debe ser no menor de 1.4 ni mayor de 1.7 g/l (48), ambos documentos marcan que debe ser expresada en ácido láctico. Los valores límites encontrados de la acidez de esta investigación van de 1.5 a 1.9 g/l, el valor medio de las observaciones es de 1.6575 y la desviación estándar de la leche pasteurizada es de  $\pm 0.09026315$ , la desviación estándar de la leche sin pasteurizar de  $\pm 0.09841696$ . Como se observa dentro de los valores encontrados en esta investigación, se rebasa el límite superior estipulado por la legislación; esto puede estar dado por una elevada cantidad de microorganismos, mala conservación de la leche, etc.; en estudios posteriores se puede buscar la causa de este aumento de acidez (39).

En la búsqueda bibliográfica realizada al respecto no se encontraron datos que permitieran comparar si los resultados obtenidos al determinar la acidez de la leche ejercían algún efecto o influenciaban de alguna manera el resultado de la prueba de fosfatasa por lo que es imposible citar autores que apoyen o contradigan los hallazgos de esta investigación.

Se seleccionó la medición del pH con potenciómetro por ser este método más exacto. La literatura consultada marca que los límites para el pH son de 6.5 a 6.7 y todos los resultados de esta investigación se encuentran en estos límites. Los valores límites del pH de la leche de esta investigación van de 6.50 a 6.70, el valor medio de las observaciones es de 6.628125 y la desviación estándar de la leche pasteurizada es de  $\pm 0.04055307$  y la desviación estándar de la leche sin pasteurizar de  $\pm 0.03748404$ .

En la investigación bibliográfica realizada no existe ningún autor que mencione resultados de analizar la relación entre los resultados de la determinación del pH y su efecto sobre el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización, por lo que no es posible discutir más sobre ello.

Se encontró que el 100% de los resultados obtenidos de esta investigación fueron negativos a la prueba de alcohol al 68%, cumpliendo así con lo que marca el reglamento (48); sin embargo, considerando los resultados obtenidos de la prueba de acidez se esperaba obtener en la prueba de alcohol al 68% una ligera floculación, lo que no ocurrió. Se sugiere por ende que en trabajos posteriores se investigue por qué se produjo este comportamiento.

En la literatura ningún autor menciona si existe algún efecto o asociación entre los resultados de la prueba de estabilidad fisicoquímica y el resultado de la verificación de la eficiencia de la pasteurización, por lo que no se pueden discutir los obtenidos en este trabajo.



## 8. RECOMENDACIONES

En este estudio solo se realizó correlación simple, esta es la razón por la cual no se puede discutir la acción de las variables en conjunto. En trabajos posteriores podrían retomarse estas y llevar a cabo correlaciones múltiples para observar los resultados y así poder determinar si las 3 variables estudiadas en conjunto pueden afectar de alguna manera los resultados de la prueba de la fosfatasa alcalina como método de elección para monitorear y/o auditar este punto crítico de control. La implementación del sistema HACCP en el taller de lácteos de la FES - C requeriría de, mediante un trabajo sistematizado, corroborar la eficiencia del método como un elemento esencial para el control de puntos críticos por medio de la pasteurización. Si bien para ello se pueden emplear los sistemas continuos de monitoreo como lo es la gráfica tiempo - temperatura que el equipo registra y puede y de hecho es un evidencia documental, con este estudio se corroboran las bases que sustentan a este método como una opción para monitorear (punto 4) y auditar (punto 7) dentro del sistema HACCP al asegurar que los riesgos son controlados y además garantizar la seguridad de este alimento hasta este punto. Las pruebas empleadas para dicho fin deben ser fáciles, rápidas, confiables y asegurar que el punto crítico esta dentro de los límites y que no existe riesgo alguno para el consumidor. Esta prueba cumple con estas características y por ello se recomienda al Taller de Lácteos de la FES C incorporarla como rutina, para asegurar que en esa leche se han eliminado riesgos inaceptables para el consumidor.

## 9. CONCLUSIONES

Se verificó la eficiencia de la pasteurización con la prueba de fosfatasa alcalina, esta es sencilla, barata, de fácil interpretación y confiable, por ello es una muy buena opción como procedimiento para empleo rutinario.

Esta prueba no es exclusiva de un producto, sino que puede utilizarse para varios productos, como fue para leche y crema. En la marca comercial utilizada se estipula que además de estos dos productos se puede utilizar para mantequilla. Tanto el trabajo en crema como el presente crean un antecedente a retomar para un estudio en mantequilla.

Al no encontrar ningún efecto por medio del análisis estadístico de los resultados de la prueba de acidez sobre los resultados de la verificación de la eficiencia de la pasteurización en este estudio, se puede decir que cada uno de estos eventos es independiente del otro y lo mismo puede mencionarse de la correlación de la verificación de la eficiencia de la pasteurización o sea la asociación de la prueba de fosfatasa alcalina con la prueba de alcohol al 68% y la de pH. Ello sustenta que no es posible sustituir la prueba de fosfatasa alcalina con otras y al mismo tiempo que, dado que tales factores no la afectan, resulta confiable aún en leches excedidas de acidez.

Los resultados de las pruebas realizadas en este trabajo no se deben tomar aisladas sino como parte integral de un todo para poder tener una idea del producto en general.

Con este trabajo se dio un paso dentro del proyecto de investigación que trata de establecer el sistema HACCP en leche pasteurizada dentro del taller de lácteos dando la opción de realizar el monitoreo y/o verificación por medio de una prueba sencilla y confiable como es la de fosfatasa alcalina que aunada a los registros de tiempo y temperatura con la que cuenta el propio aparato pasteurizador, asegurar que este punto crítico de control así como los riesgos se encuentran controlados garantizando la seguridad de este alimento hasta este punto de la cadena de proceso para el caso del Taller de Lácteos de la FES.C..

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdou, A. H.: La situación en África. *Salud mundial*, Julio: 14 - 15 (1985).
2. Alais C.: Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 4a ed. *Reverté, S. A.*, España, 1985.
3. Amiot, J.: Ciencia y tecnología de la leche. Principios y aplicaciones. 1a. ed. *Acribia*, Zaragoza, España, 1991.
4. Arambulo, III P., Almeida, R. C., Cuéllar S. J. y Belotto, A. J.: La venta de los alimentos en la vía pública en América. *Boletín OPS.*, 118 (2): 97 - 107 (1995).
5. Barradas, S. H.; Leonidez, L. P.; Schulze, C. E. y Pérez, P. J. E.: Manual de técnicas y procedimientos para análisis físico - químico de leche pasteurizada. *Secretaría de Salud, Secretaría de Servicios de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública*. México D. F., 1989.
6. Benjamin, M. M.: Manual de patología clínica en veterinaria. 4a. Impresión. *Limusa*, México, 1984.
7. Bryan, F. L.: Evaluaciones por análisis de peligros en puntos críticos de control. Guía para identificar peligros y evaluar riesgos relacionados con la preparación y conservación de alimentos. 1a ed. *Organización Mundial de la Salud, Ginebra*, España, 1992.
8. Bulletin of the International Dairy Federation: Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 262: 32 - 35 (1991).
9. Carrion, A. M. L.: Análisis de los parámetros fisicoquímicos para determinar la presencia de posibles adulteraciones en leche fluida pasteurizada. Tesis de licenciatura. *Laboratorio Nacional de Salud Pública*. Secretaría de Salud, México, D. F., 1987.
10. Coburn, P. S., Dennis, M. J., Pauli, T. A., Ericson, K. L. and Townsend, D. W.: Alkaline phosphatase activity and piridoxal phosphate concentration in the milk of various species. *J. Nutr.*, 122 (12): 2348 - 2353 (1992).
11. Cordier, J. L.: Quality assurance and quality monitoring of UHT processed foods. *J. Soc. Dairy Tech.*, 43 (2): 42 - 44 (1990).
12. Desrosier, N. W.: Conservación de los alimentos. 2a. ed. *Compañía Editorial Continental, S. A.*, México D. F., 1977.

13. Desrosier, N. W.: Elementos de tecnología de alimentos. 2a ed. *Compañía Editorial Continental, S. A.* México, 1977.
14. Enciclopedia Salvat Diccionario. *Salvat Mexicana de Ediciones, S. A. de C. V.* México, 1983.
15. Equipo Técnico de Alfa Laval Food: Manual de Industrias lácteas. 2a ed. *Iragra S. A.*, Baedala, Madrid, 1990.
16. FAO/OMS: Formulación de normas. *Salud Mundial.*, Julio: 19 (1985).
17. Fujikura, T.: Brucelosis. *Salud Mundial.*, Julio: 13 (1985).
18. Gallan, L. A.: Measurement of lactulose formed in dairy products exposed to high heat treatments. *J. Dairy Sci.*, 74 (suplement 1).
19. Hall, H. S.: Fábricas lecheras experimentales estandarizadas. 1a. ed. *FAO*, Hungría, 1976.
20. Hart, F. L. y Fisher H. J.: Análisis moderno de los alimentos. 2a. reimpresión. *Acribia*, Zaragoza España, 1991.
21. Hernández, S. R.; Fernández, C. C. y Baptista, L. P.: Metodología de la investigación. McGraw Hill. *Interamericana de México S. A. de C. V.* México D. F., 1991.
22. Humbert, E. S., Campbell, J. N., Blankenagel, G. and Gebre-Egziabher, A.: Extended storage of raw milk II. The role of thermization. *Can. Inst. Food Sci. and Tech. J.*, 18 (4): 302 - 305 (1985).
23. Infante G. S. y Zárate de Lara G. P.: Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. 1a ed. *Trillas S. A. de C. V.* México, 1984.
24. Judikins, H. F.: La leche, su producción y procesos industriales. 5a impresión. *Compañía editorial continental S. A.* México, 1976.
25. Karmas, R. and Kleyn, H. D.: Determination and interpretation of alkaline phosphatase activity in experimental and commercial butters. *J. Dairy Sci.*, 73 (3): 584 - 589 (1990).
26. Kennet E. S.: HACCP establishing hazard analysis and critical control point programs. A workshop manual. *The Food Processors Institute*, Section VI, appendix HACCP principles for food production contents of HACCP/QC Manual, 1993.
27. Longree K. y Blaker G. G.: Técnicas sanitarias. 2a. ed. *Macmillan Publishing Company*, Estados Unidos de America, 1982.

28. López, P. J., y otros: Calidad y HACCP. Memorias del primer curso - taller análisis de riesgo en alimentos. *FES - Cuautitlán*. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996.
29. Luquet M. F., Keilling J. y De Wilde R.: Leche y productos lácteos. Vaca-Oveja-Cabra. Vol 1. La leche de la mama a la lechería. 1a. ed. *Acribia, S. A.* Zaragoza, España, 1991.
30. MC Kellar, R. C. and Emmons, D. B.: Monitoring heat treatment of milk. *Modern Dairy*, June: 12 - 13 (1992).
31. McKellar, R. C., Cholette, H. and Emmons, D. B.: Modification of the alkaline phosphatase assay for butter. *Can Inst. Food Sci. and Tech J.*, 21 (1): 97 - 101 (1988).
32. Motarjemí, K., Kaferstein, F., Moy, G. y Quevedo, F.: Alimentos de destete contaminados: un importante factor de riesgo de diarrea y malnutrición asociada. *Boletín OPS*, 116 (4): 311 - 330 (1994).
33. OMS.: Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos. *Salud mundial*, Julio: 7 (1985).
34. OPS: Las condiciones de salud en las Américas Vol. 1, edición de 1994. *Publicación científica No. 549*, Organización Panamericana de la Salud, 1994.
35. Pearson, D.: Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. 1a reimpression. *Acribia*, Zaragoza España, 1986.
36. Pérez, G. E. y colaboradores: Bioquímica y microbiología de la leche. 1a edición. *Limusa*, México, 1984.
37. Piñón, Q. A.: Confirmación de pasteurización en cremas sin marca, expandida en mercados públicos del municipio de Cuautitlán Izcalli. Edo. de Méx. Tesis de licenciatura. *FES - Cuautitlán*, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1995
38. Polydorou, K.: Mataderos rurales. *Salud Mundial*, Julio: 8 - 9 (1985).
39. Potter, N. N.: La ciencia de los alimentos. 1a ed. *Edutex. S. A.*, México, 1973.
40. PUAL: Garantía de la calidad en la industria alimentaria. Memorias curso UNAM. Octubre 1995.
41. Reinheimer, J. A., Suarez, V. B. and Maye, M. A.: Microbial and chemical changes in refrigerated pasteurized milk processed in the Santa Fe area (Argentina). *Aust. J. Dairy Tech.*, 48 (1): 5 - 9 (1993).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 42.Revilla R. A.: Tecnología de la leche. Procedimiento, manufactura y análisis. 7a ed. *Herrero Hermanos, Sucesores S. A.*, México, 1983.
- 43.Schönherr W.: Manual práctico de análisis de leche. 1a. ed. *Acribia*, Zaragoza, España, 1959.
- 44.Secretaría de Salud: Aplicación de análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos en la industria de leche pasteurizada. *Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario*. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México D. F. 1994.
- 45.Secretaría de Salud: Manual de aplicación del análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos. *Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario*. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México, D. F. 1993.
- 46.Secretaría de Salud: Manual de buenas prácticas de higiene y sanidad. *Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario*. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México, D. F. 1993.
- 47.Secretaría de Salud: Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. *Secretaría de Salud*. Miércoles 21 de febrero de 1996.
- 48.Secretaría de Salud: Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. *Secretaría de Salud*, México, D. F., 1988.
- 49.Singh, C. M. y Koulkouskii A.: El peligro nos acecha en la comida. *Salud Mundial*, Julio: 5 - 7 (1985).
- 50.Soroa y P. J. M.: Industrias lácteas. 5a ed. *Aedos*, Barcelona, España, 1974.
- 51.Steel, R. G. D. y Torrie, J. H.: Bioestadística: Principios y procedimientos. 2a ed. *Mc Graw - Hill Latinoamericana, S. A.* México, 1985.
- 52.Warner, J. N.: Principios de la tecnología de lácteos. 1a ed. *AGT Editor S. A.*, México, 1976.
- 53.Wayne, W. D.: Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1a ed. *Limusa, S. A.* México 1982.
- 54.Wiley, A. and Hui, Y. H.: Encyclopedia of food science and technology. *Interscience Publication.*, Estados Unidos, 1991.

55. Williams, D. J. and Nottingham, S. M.: Suitability of a modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test for goats' milk: collaborative study. *Aust. J. Dairy Tech.*, 45 (1): 21 - 23 (1990).
56. Wiseman, A.: Manual de biotecnología de las Enzimas. 1a ed. *Acribia*, Zaragoza, España, 1991.
57. Zadow, J. G.: Extending the shelf life of dairy products. *Food Australia*, 41 (9): 935 - 937 (1989).

***"Era necesario concluir: Hice un esfuerzo; tapé el agujero  
y lo cubrí con cal. Requiescat in pace."  
Edgar Allan Poe.***