
NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-091-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. LECHE PASTEURIZADA DE VACA. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-
Secretaría de Salud.

JOSÉ MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3 fracción XXII, 13, 194 fracción I, 197, 401 BIS, 401 BIS 1, 401 BIS 2 de la Ley General de Salud; 3o. fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, VI, VIII, XI, XIII, 41, 43, 47 fracción IV, 50 y 53 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2o. fracción III inciso b), 347, 348 fracción I y demás relativos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 23 de marzo de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 27 de octubre de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuesta a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente: Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Leche Pasteurizada de Vaca. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

OPERADORA METROPOLITANA DE LÁCTEOS, S.A. DE C.V.
SECRETARÍA DE SALUD

DIRECCIÓN GENERAL DE CONTROL SANITARIO DE BIENES Y SERVICIOS
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRÁULICOS (AHORA:
SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL)
DIRECCIÓN GENERAL DE DESARROLLO PECUARIO
SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS COMERCIALES
PROCURADURÍA FEDERAL DEL CONSUMIDOR
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN TECNOLÓGICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE QUÍMICA
ASOCIACIÓN DE GANADEROS PRODUCTORES DE LECHE PURA, S.A.
CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN
CÁMARA NACIONAL DE INDUSTRIALES DE LA LECHE
CONFEDERACIÓN NACIONAL GANADERA
CONSEJO NACIONAL DE PASTEURIZADORES
LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A.

ÍNDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. DISPOSICIONES SANITARIAS
6. ESPECIFICACIONES SANITARIAS
7. MUESTREO
8. MÉTODOS DE PRUEBA
9. ETIQUETADO
10. ENVASE Y EMBALAJE
11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12. BIBLIOGRAFÍA
13. OBSERVANCIA DE LA NORMA
14. VIGENCIA
15. APÉNDICE NORMATIVO
APÉNDICE A
16. APÉNDICE INFORMATIVO
APÉNDICE A
APÉNDICE B

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

- 1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las disposiciones y especificaciones sanitarias de la Leche pasteurizada de vaca y Leche pasteurizada de vaca con sabor.
- 1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

2. REFERENCIAS

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-051-SCFI-1994.	Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
NOM-086-SSA1-1994.	Alimentos y Bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones Nutrimientales
NOM-092-SSA1-1994.	Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
NOM-093-SSA1-1994.	Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.
NOM-109-SSA1-1994.	Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
NOM-110-SSA1-1994.	Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
NOM-113-SSA1-1994.	Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
NOM-114-SSA1-1994.	Método para la determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos.
NOM-115-SSA1-1994.	Método para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.
NOM-117-SSA1-1994.	Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.
NOM-120-SSA1-1994.	Prácticas de Higiene y Sanidad para el proceso de Alimentos, Bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
NOM-127-SSA1-1994.	Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

3. DEFINICIONES

Para fines de esta Norma se entiende por:

- 3.1 Aditivos para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o su conservación.
- 3.2 Buenas prácticas de fabricación, conjunto de Normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.

- 3.3 Envase o empaque, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.
- 3.4 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté impresa, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.
- 3.5 Fecha de caducidad, fecha límite en que se considera que un producto preenvasado almacenado en las condiciones sugeridas por el fabricante, reduce o elimina las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.
- 3.6 Higiene, las medidas necesarias para garantizar la sanidad e inocuidad de los productos en todas las fases del proceso hasta su consumo final.
- 3.7 Inocuo, aquello que no hace o causa daño a la salud.
- 3.8 Leche de vaca para consumo humano, producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro.
- 3.9 Límite máximo, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.
- 3.10 Limpieza, conjunto de procedimientos que tiene por objeto eliminar tierra, residuos, suciedad, polvo, grasa u otras materias objetables.
- 3.11 Lote, cantidad de producto elaborado en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad.
- 3.12 Materia extraña, toda aquella sustancia, resto o desecho orgánico o no que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: excretas y pelos de cualquier especie, fragmentos de hueso e insectos que resultan perjudiciales para la salud.
- 3.13 Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo.
- 3.14 Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece esta Norma.
- 3.15 Muestra, número total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.
- 3.16 Pasteurización, proceso al cual es sometido el producto a una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir la flora bacteriana patógena y casi la totalidad de la flora banal.

3.17 Refrigeración, método de conservación físico con el cual se mantiene el producto a una temperatura máxima de 7°C (280 K).

4. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

BPF	buenas prácticas de fabricación
°C	grados Celsius
g	gramo
l	litro
máx	máximo
µg	microgramo
ml	mililitro
mg	miligramo
UF	unidades de fenol
kg	kilogramo
CI	color index
%	por ciento
UFC	unidades formadoras de colonias
UI	unidades internacionales
/	por
M	molar
pH	potencial de hidrógeno
No	número
+	más
x	signo de multiplicación
N	normal
=	igual
cm	centímetro
min	minutos
mm	milímetros
µm	micrometro
nm	nanómetros
mM	milimolar
µl	microlitro
UV	ultravioleta
±	más-menos
>	mayor que
<	menor que
h	hora
K	grados Kelvin

Cuando en la presente Norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

5. DISPOSICIONES SANITARIAS

Los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

- 5.1 Los materiales del equipo y utensilios que se empleen deben cumplir con las características establecidas en la NOM-120-SSA1-1994 Prácticas de Higiene y Sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas y en la NOM-093-SSA1-1994 Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.
- 5.2 Los detergentes y sanitizantes que se empleen para el lavado y desinfección de los utensilios y el equipo utilizado, deben ser removidos de forma tal que no representen riesgo a la salud, ni modifiquen las características del producto. En el apéndice informativo B se enlistan los sanitizantes recomendados.
- 5.3 Los productos objeto de esta Norma deben pasteurizarse de la siguiente manera:
 - 5.3.1 Se someterán a una temperatura de 63°C, sosteniéndola por un período mínimo de 30 minutos (Pasteurización lenta) o,
 - 5.3.2 Se someterán a una temperatura de 72°C, sosteniéndola por un período mínimo de 15 segundos (Pasteurización rápida) o,
 - 5.3.3 Someterlos a otra relación de tiempo y temperatura cuyo efecto sea equivalente.
 - 5.3.4 Una vez alcanzados respectivamente las temperaturas y tiempos señalados, se enfriarán bruscamente a 4°C.
- 5.4 En la leche pasteurizada de vaca para su transporte, almacenamiento y venta no se permite realizar las siguientes operaciones:
 - 5.4.1 Colocar hielo o mantas húmedas directamente sobre las canastillas o envase para su conservación.
 - 5.4.2 Mantenerla durante su transporte a una temperatura superior a los 9°C.
 - 5.4.3 Reprocesar los productos que contengan microorganismos patógenos o sustancias tóxicas que los hagan no aptos para su consumo.
 - 5.4.4 La fabricación de los productos objeto de esta Norma en establecimientos distintos a las plantas pasteurizadoras, o locales que no reúnan las condiciones sanitarias que establece la Secretaría de Salud.

6. ESPECIFICACIONES SANITARIAS

Los productos objeto de este ordenamiento deben cumplir con las siguientes especificaciones:

6.1 Físicas

6.1.1 Estar libres de materia extraña.

6.1.2 Sensoriales

Color: Característico del tipo de producto que se trate

Olor: Característico del producto, exento de olores extraños

Sabor: Característico, exento de sabores extraños

6.2 Físico-químicas

Deben dar reacción negativa a la prueba de fosfatasa y a la de inhibidores. Tener una acidez mínima de 1,3 o máxima de 1,7g/l expresada como ácido láctico.

6.3 Microbiológicas

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
Mesofílicos aerobios UFC/ml	30 000
Organismos Coliformes totales UFC/ml en planta	10
Organismos Coliformes totales UFC/ml en punto de venta	20
Salmonella spp ^{7*} en 25 ml	Ausente
Staphylococcus aureus ^{8*} en 25 ml	Ausente
Listeria monocytogenes ^{9*} en 25 ml	Negativo

6.4 Metal pesado o metaloide

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO (mg/kg)
Arsénico (As)	0,2
Mercurio (Hg)	0,005
Plomo (Pb)	0,1

6.5 Aflatoxinas

El límite de aflatoxinas M₁ para los productos objeto de esta Norma no debe ser mayor de 0,05 µg/l.

6.6 Aditivos para alimentos

En la elaboración de la leche pasteurizada de vaca con sabor, se permite el empleo de los siguientes aditivos para alimentos, dentro de los límites que se indican:

6.6.1 Acidulantes, alcalinizantes o reguladores de pH

ADITIVO	LÍMITE MÁXIMO
Bicarbonato de amonio o potasio	BPF
Carbonato de amonio o magnesio	BPF
Carbonato de potasio o sodio	BPF
Hidróxido de amonio o magnesio	BPF
Hidróxido de potasio o sodio	BPF

6.6.2 Emulsivos y estabilizadores

ADITIVO	LÍMITE MÁXIMO
Agar	BPF
Acido algínico	BPF
Alginato de amonio, potasio o sodio	BPF
Carboximetil celulosa de sodio	BPF
Carragenina	BPF
Carragenatos de amonio, calcio, potasio o sodio	BPF
Fosfato dibásico de sodio	BPF
Gelatina	BPF
Goma algarrobo	BPF
Goma arábica	BPF
Goma Guar	BPF
Goma Karaya	BPF
Lecitina	BPF
Hidroxipropil metil celulosa	BPF
Mono y Diglicéridos	BPF
Pectina	BPF
Polioxietilen 20 (Sorbitán)	0,5%
Polisorbatos 65	0,5%

6.6.3 Colorantes

ADITIVO	LÍMITE MÁXIMO (mg/kg)
Annatto CI 75120	0,05 expresado como bixina
Cantaxantina CI 40850	BPF
Clorofila CI 75810	BPF
Rojo No. 6 CI 16255 (Ponceau o punzo 4R)	BPF
Rojo No. 3 Carmoisina CI 14720	BPF
Riboflavina	BPF
Azafrán	BPF
Dióxido de Titanio CI 77891	BPF
Cúrcuma	BPF
Xantófilas	BPF
b-Apo-8-Carotenal CI 40820	35
Caramelo	BPF
Rojo Allura CI 16035	300 solos o en combinación.
Eritrocina CI 45430	
Indigotina CI 73015	

Amarillo No. 6 (amarillo ocase)
CI 15985
Tartrazina CI 19140
Verde No. 3 FCF (verde fuerte) 100
CI 42053

6.6.4 Saborizantes

En la elaboración de leche pasteurizada de vaca con sabor, se permite el empleo de los saborizantes que establece el Reglamento de acuerdo a las BPF, además de los señalados en el Acuerdo Secretarial que da a conocer la lista de sustancias sintético-artificiales que solas o mezcladas podrán utilizarse para la elaboración de saboreadores o aromatizantes sintético-artificiales que se emplean en la industria de alimentos y bebidas.

6.6.5 Edulcorantes

Si en la elaboración de la leche pasteurizada de vaca con sabor se emplean edulcorantes sintéticos se debe cumplir con lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994 Alimentos y Bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones Nutrimientales.

6.6.6 Conservadores

6.6.6.1 Se prohíbe el empleo de conservadores en la elaboración de los productos objeto de esta Norma.

6.6.6.2 En la elaboración de la leche pasteurizada de vaca con sabor sólo se aceptará la presencia de ácido sórbico, ácido benzoico o las sales de sodio o potasio de los ácidos anteriores, como efecto de la transferencia de los ingredientes opcionales.

6.7 Nutrimientales

La leche pasteurizada de vaca cuyo contenido de grasa propia de la leche sea de 16g/l como máximo, debe ser restaurada con 2000 UI de vitamina A.

7. MUESTREO

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

8. MÉTODOS DE PRUEBA

Para la verificación de las especificaciones microbiológicas, metales y metaloides que se establecen en esta Norma, se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Capítulo de Referencias. Para la verificación de las especificaciones fisico-químicas, vitamina A así como Aflatoxinas se aplicarán los métodos establecidos en el apéndice normativo A.

9. ETIQUETADO

La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe sujetarse a lo siguiente:

Debe figurar:

- 9.1 La fecha de caducidad, señalando con letra o número el día, mes y año.
- 9.2 El contenido de vitamina "A" de acuerdo a lo establecido en el punto 6.7.
- 9.3 Las leyendas "Manténgase en Refrigeración" o "Consérvese en Refrigeración".

10. ENVASE Y EMBALAJE

10.1 Envase

Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a las distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren las características físicas, químicas y sensoriales.

10.2 Embalaje

Se debe usar material resistente que ofrezca la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que facilite su manipulación, almacenamiento y distribución.

11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta Norma no tiene concordancia con Normas Internacionales.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 12.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D. F.
- 12.2 Secretaría de Salud 1992. Ley General de Salud. México, D.F.
- 12.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. México, D. F.
- 12.4 Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1974. Anteproyecto de Normas Sanitarias. Dirección General de Control Sanitario de Alimentos, Bebidas y Medicamentos.
- 12.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. NORMA-Z-013/02 Guía para la Redacción, Estructuración y presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D. F.
- 12.6 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Sistema General de Unidades de Medida. México, D. F.

- 12.7 Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 1990 15th Edition. Vol 11, 980. 21 p. 1200
- 12.8 Code of Federal Regulations. 1989. Parts 170 to 199. U.S.A.
- 12.9 Codex Alimentarius. Abridged Version. 1989. FAO/OMS.
- 12.10 Food and Drugs Act and Regulations. 1989. Canada.
- 12.11 Ordennance Sur les exigences hygieniques et microbiologiques relatives aux denrées alimentaires, objets usuels et biens de consommation. 1985. Suiza.
- 12.12 Ordennance Sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires. 1986. Suiza.
- 12.13 Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. U.S. Departament of Health and Human and Services, FDA. 1989 revision, U.S.A.
- 12.14 Alais Ch. 1988. Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera. Ed. 7°. C.E.C.S.A. México, D.F. p 15. 445.
- 12.15 Judkins F. 1979. La Leche su Producción y Procesos Industriales. Ed. 8°. C.E.C.S.A. México, D.F. p. 9, 362.
- 12.16 O'Brien L. 1986. Alternative Sweeteners, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.
- 12.17 Ortiz Cornejo A. 1991. ANDSA. Manual de procedimientos para el análisis de Aflatoxinas.

13. OBSERVANCIA DE LA NORMA

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. VIGENCIA

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio a los noventa días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

APÉNDICE NORMATIVO A

A MÉTODOS DE PRUEBA

1. Recolección de la muestra

Utilizar un frasco de vidrio o de plástico provisto de tapón de cierre hermético, libre de fenol. Se recomienda el empleo de tapones de hule. Transportar la muestra en una hielera con hielo para lograr una temperatura de 10°C o menos; evitando su congelación.

En los casos de envío de muestras de lugares distantes, por medio del correo, express, etc.; se recomienda el uso de preservativos tales como tabletas de 0,5 g de cloruro mercúrico o dicromato de potasio y excipiente hasta un total de 7g. (Utilizar una tableta por cada 250 ml de leche) o una solución de formaldehído al 36% (0,85 ml por cada 250 ml de leche).

Estos preservativos no interfieren con las pruebas físico-químicas rutinarias que se practican en la leche, con excepción de la prueba de la fosfatasa, en la que solamente se admite como preservativo el cloroformo. (De 1 a 3 ml por cada 100 ml de leche).

2. Preparación de la muestra

Antes de proceder al estudio fisicoquímico de la leche, homogeneizar la muestra por agitación e inversión repetida del recipiente que la contiene. En los casos que se observe la formación de grumos, calentar la muestra en baño de agua a temperatura aproximada de 38 °C y emplear un agitador con gendarme para facilitar el desprendimiento de la crema adherida a la pared del frasco o del tapón.

Mantener la leche a 20 °C al tomar las alícuotas necesarias para los análisis.

Los reactivos a emplear en el método deben ser de grado analítico.

Cuando se mencione agua (H₂O), debe entenderse que se trata de agua destilada.

3. Acidez

3.1 Fundamento

La leche generalmente tiene una acidez de 1,3 a 1,7 g/l expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0,05 - 0,08%) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez el dióxido de carbono (0,01 - 0,02%), los citratos (0,01%) y la albúmina (menos del 0,001%).

La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio 0,1N, utilizando fenolftaleína como indicador.

3.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril.
- Pipeta graduada de 10 ml
- Pipeta volumétrica de 20 ml
- Matraz de 125 ml
- Bureta de 50 ml graduada en 0,1 ml

3.3 Reactivos

- Hidróxido de sodio 0,1 N (valorado) NaOH
- Solución indicadora al 1% de fenolftaleína (C₆H₄OH)₂COC₆H₄CO

- Alcohol etílico (C₂H₅OH)
- Solución indicadora al 0,12% de cloruro o acetato de rosanilina.

3.3.1 Preparación de soluciones

- Pesar 1,0 g de fenolftaleína en 100 ml de alcohol etílico.
- Pesar 0,12 de cloruro o acetato de rosanilina y disolverlo con alcohol etílico al 95% (v/v), adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial y llevar a un volumen de 100 ml.
- Diluir 1 ml de esta solución con 500 ml de alcohol etílico al 95%.
- Almacenar ambas soluciones en frasco ámbar.

3.4 Procedimiento

Medir 20 ml de muestra en un matraz. Añadir 2 ml de fenolftaleína y titular con hidróxido de sodio 0,1 N hasta la aparición de un color rosado persistente cuando menos un minuto, empleando como guía de color una muestra de control de acetato o cloruro de rosanilina preparada de la siguiente manera:

Medir 20 ml de muestra en un matraz. Añadir 2 ml de la solución de acetato o cloruro de rosanilina; agitar con una varilla de vidrio.

3.5 Cálculo de la acidez

$$\text{Acidez (g/l)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

Donde:

V = ml de solución de NaOH 0,1 N, gastados en la titulación

N = normalidad de la solución de NaOH

M = volumen de la muestra en ml

4. Fosfatasa residual

4.1 Fundamento

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

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

4.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril
- Tubos de ensayo de 15 x 15 mm

- Tubos de ensayo con graduación en ml de 0 a 15
- Pipetas de Mohr graduadas en 0,1 ml de 1, 5 y 10 ml
- Embudos de filtración, tallo corto
- Baño termostático con agua controlada a 37 - 45 °C
- Parrilla de calentamiento, de control termostático
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro apropiado para lecturas de espectro visible.

4.3 Reactivos

- Solución reguladora de hidróxido de bario-borato (pH $10,6 \pm 0,15$ a 25°C)
- Hidróxido de bario octahidratado ($\text{BaH}_2\text{O}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$)
- Ácido bórico (BH_3O_3)
- Solución reguladora para desarrollo de color (pH $9,8 \pm 0,15$ a 25°C)
- Metaborato de sodio (NaBO_2)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Solución reguladora para dilución de color
- Solución reguladora patrón para calibrar el potenciómetro (0,00996 M, pH 9,18 a 25 °C)
- Borato de sodio decahidratado ($\text{B}_4\text{NaO}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Solución reguladora de sustrato (Para valorar la pasteurización)
- Fenilfosfato disódico ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4$)
- Alcohol butílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)
- Solución para determinaciones en leche cruda
- Reactivo precipitante de proteínas Zinc - Cobre
- Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
- Solución de 2,6-Dibromoquinona clorimida (B.Q.C.)
- ($\text{OC}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{NCl}$)
- Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- Solución de sulfato de cobre para patrones (0,5%)
- Solución de alcohol butílico
- Patrones de fenol
- Solución madre
- Fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)
- Solución patrón de comparación

4.3.1 Preparación de soluciones

4.3.1.1 Solución reguladora de hidróxido de bario - borato

Disolver en agua 25 g de hidróxido de bario octahidratado y diluir a 500 ml; por separado disolver 11 g de ácido bórico y diluir a 500 ml; Calentar cada una de las soluciones a 50°C, y mezclarlas; agitar y enfriar aproximadamente a 20°C; filtrar y conservar el filtrado en recipiente perfectamente tapado. Cuando se use para leche, diluir 500 ml de este regulador con 500 ml de agua.

4.3.1.2 Solución reguladora para desarrollo de color (pH $9,8 \pm 0,15$ a 25°C)

Disolver 6 g de metaborato de sodio y 20 g de cloruro de sodio y diluir a 1 l con agua.

4.3.1.3 Solución reguladora para dilución del color

Diluir 100 ml de la solución anterior (4.3.1.2) a un litro con agua.

4.3.1.4 Solución reguladora patrón para calibrar el potenciómetro (0,00996 M, pH 9,18 a 25 °C)

Disolver 3,80 g de borato de sodio decahidratado en agua y diluir a un litro (en ningún caso debe de secarse esta sal en el horno, antes de emplearse). Para evitar contaminación con el bióxido de carbono mantener perfectamente tapado el recipiente o protegerlo con un tubo de cal sodada (Ca(OH)_2 y NaOH)

Esta solución reguladora debe utilizarse dentro de los 10 min siguientes a su extracción del frasco.

4.3.1.5 Solución reguladora de sustrato

4.3.1.5.1 Para valorar la pasteurización

Disolver 0,10 g de fenilfosfato disódico cristalizado libre de fenol en 100 ml de la mezcla que se obtiene con un volumen (50 ml) de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (4.3.1.1). El fenilfosfato disódico cristalizado debe conservarse siempre en el congelador o en un desecador. En el caso de que el fenilfosfato disódico no esté libre de fenol, debe ser purificado como sigue:

Disolver 0,5 g de la sal en 4,5 ml de agua; agregar 0,5 ml de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (4.3.1.1) y dos gotas de reactivo B.Q.C. (4.3.3); dejar en reposo 30 minutos; agregar 2,5 ml de alcohol butílico y dejar en reposo hasta que se separe el alcohol, con objeto de eliminar el color. Eliminar el alcohol con gotero o pipeta Pasteur.

Diluir finalmente 1 ml de la solución acuosa a 100 ml con el regulador de sustrato (4.3.1.5.1). Calentar la solución a 85°C por 2 min, tapar inmediatamente y guardar en el refrigerador. Esta solución madre debe mantenerse en el refrigerador durante algunos días. Al emplearse, desarrollar el color y eliminarlo por extracción como se ha indicado. La solución es estable por un año si se encuentra bien guardada y con mínima exposición al aire.

4.3.1.5.2 Solución para determinaciones en leche cruda

La preparación del reactivo, se efectúa como se ha descrito en la valoración de la pasteurización excepto que se disuelven 0,20 g de fenilfosfato disódico o bien se utilizan 2 ml de la solución purificada.

4.3.2 Reactivo precipitante de proteínas Zinc-Cobre

Disolver 3 g de Sulfato de zinc heptahidratado y 0,6 g de Sulfato de cobre pentahidratado en agua y diluir a 100 ml.

4.3.3 Solución de 2,6-Dibromoquinonaclorimida (B.Q.C.)

Disolver 40 mg de polvo de 2,6-Dibromoquinonaclorimida en 10 ml de alcohol etílico y conservar esta solución en frasco gotero ámbar.

Antes de usarse los nuevos frascos de B.Q.C. deberán ser comprobados preparando curvas patrón con fenol y comprobados con los de la solución en buen estado; hacer esta comprobación cuando menos dos veces por año.

Manteniendo el B.Q.C. en el congelador, el reactivo es estable durante un mes; no debe usarse cuando se torna color café.

4.3.4 Solución de sulfato de cobre para patrones (0,05%)

Disolver 0,05 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua.

4.3.5 Alcohol butílico

Emplear alcohol butílico normal, de punto de ebullición de 116 a 118 °C. Para ajustar su pH, mezclar un litro de éste, con 50 ml de la solución reguladora para desarrollo de color (4.3.1.2). Conservar en frasco de tapón de vidrio esmerilado.

4.3.6 Patrones de fenol

4.3.6.1 Solución madre

Pesar exactamente 1,0 g de fenol puro; transferir a un matraz volumétrico de 1 litro y diluir hasta la marca con agua, mezclando perfectamente (cada ml contiene 1 mg de fenol). Esta solución mantenida en el refrigerador es estable durante varios meses.

4.3.6.2 Solución patrón de comparación

Diluir 10 ml de solución madre (4.3.6.1) a un litro con agua y mezclar (1 ml contiene 10 µg, 0,00001 g). Para preparar patrones más diluidos, diluir 5, 10, 30 y 50 ml en 100 ml para que respectivamente contengan 0,5, 1,0, 3,0 y 5,0 µg o unidades de fenol por mililitro. Estas soluciones patrón mantenidas en el refrigerador no se deben emplear después de una semana.

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

4.3.6.3 Preparación de la curva patrón de comparación

En series de tubos (de preferencia graduados en 5 y 10 ml), medir volúmenes adecuados de las soluciones patrón, a fin de obtener un margen favorable de patrones según las necesidades. Incluir 0,0 (testigo), 0,5 1,0 3,0 10,0 20,0 30,0 y 40,0 unidades. Con objeto de aumentar la intensidad del color azul y la estabilidad de los patrones agregar a cada tubo 1 ml de la solución de sulfato de cobre al 0,05% (4.3.4) y a continuación 5 ml de la solución reguladora para dilución de color (4.3.1.3) diluyendo el contenido de cada tubo a 10 ml con agua. Agregar 4 gotas (0,08 ml) de la solución B.Q.C. (4.3.3) mezclar y esperar 30 minutos, a temperatura ambiente para desarrollar el color.

En caso de emplear el procedimiento de extracción con alcohol butílico normal, proceder como se indica más adelante.

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

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

4.4 Precauciones generales

La homogeneización de la leche para la determinación de fosfatasa es fundamental antes de desarrollar la técnica. Colocar varios mililitros en un tubo de ensayo pequeño, tapar y guardar en el refrigerador; si es necesario el empleo de un conservador agregar cloroformo en concentraciones de 1-3 ml por cada 100 ml de leche.

4.5 Procedimiento

4.5.1 Medir con pipeta 1 ml de muestra preparada en 2 o 3 tubos (se necesita un tubo como testigo y se recomienda preparar dos o más tubos para determinaciones por duplicado); en caso de la leche de cabra emplear 3,0 ml de la muestra; calentar el tubo testigo en un baño termostático con agua a ebullición y cubierto (la temperatura interna del tubo debe estar entre 85 y 90°C), alrededor de un minuto y dejar enfriar a temperatura ambiente. A partir de esta etapa manejar de igual manera el testigo y las muestras.

4.5.2 Agregar a cada tubo 10 ml de la solución reguladora de sustrato regulador para valorar la pasteurización (4.3.1.5) o para las determinaciones cuantitativas en leche cruda; tapar los tubos y mezclar ($\text{pH } 10,0 \pm 0,15$). Este sustrato, es adecuado para leche fresca, leche descremada y suero obtenido en la preparación de quesos; para

leche vieja o ligeramente agria se utiliza el sustrato preparado en la solución reguladora de hidróxido de bario-borato sin diluir (4.3.1.1). En el caso de bebidas que contengan chocolate, se utiliza el sustrato con solución reguladora de hidróxido de bario-borato (4.3.1.1) diluido con un cuarto de volumen de agua; para sueros muy ácidos obtenidos en la preparación de mantequilla, con pH menor a 4,5, se emplea el sustrato con solución reguladora hidróxido de bario-borato (4.3.1.1) pero empleando 26 g de hidróxido de bario octahidratado en lugar de 25 g; lo mismo sucede cuando la muestra proviene de leche de cabra, en cuyo caso emplear este regulador.

Para resultados cuantitativos exactos en muestras desconocidas, ajustar el pH a 10,0 - 10,05.

- 4.5.3 Inmediatamente después de agregar la solución de sustrato incubar los tubos en baño termostático con agua durante una hora a 37 - 38 °C mezclar o agitar ocasionalmente durante este tiempo. Trasladar los tubos a un recipiente con agua a ebullición durante 1 minuto (la temperatura del contenido de los tubos, debe ser controlada con un termómetro sumergido en un tubo de tamaño y volumen de contenido igual al de los de la prueba, debe ser de 85 - 90 °C).

Dejar enfriar los tubos a la temperatura ambiente por inmersión en un recipiente de agua fría.

- 4.5.4 Agregar con una pipeta 1 ml de la solución precipitante de proteínas zinc-cobre (4.3.2) a los tubos que contienen leche fresca, grasa butírica o suero de queso; para leches viejas o ligeramente agrias o sueros ácidos, sustituir el mililitro del reactivo precipitante de proteínas zinc-cobre (4.3.2) con otro preparado, de una solución que contenga 6,0 g de sulfato de zinc heptahidratado por 100 ml. Para bebidas con chocolate emplear 1 ml de una solución preparada con 4,5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml.
- 4.5.5 Mezclar perfectamente el contenido de los tubos. El pH de la mezcla debe estar entre 9,0 - 9,1; filtrar (empleando embudos de 5 cm de diámetro y papel filtro No. 42 de 9 cm de diámetro o bien el No. 2 o su equivalente) y recoger 5 ml del filtrado en un tubo, de preferencia graduado en 5 y 10 ml.
- 4.5.6 Agregar 5 ml de solución reguladora para desarrollo de color (4.3.1.2) el pH de la mezcla debe estar entre 9,3 - 9,4.
- 4.5.7 Agregar 4 gotas del reactivo B.Q.C. (4.3.3) mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos para desarrollo de color.

En los casos en que se investigue pasteurización deficiente se agregan 2 gotas del reactivo de B.Q.C (4.3.3).

- 4.5.8 Determinar la intensidad del color azul con cualquiera de los siguientes métodos:
- 4.5.8.1 Método espectrofotométrico

Leer las intensidades de color del tubo testigo y de las muestras a 610 nanómetros, restar la lectura del testigo de la lectura del tubo de la muestra y convertir el resultado a unidades de fenol utilizando la curva patrón (4.3.6.2).

Ordinariamente se hace innecesaria la extracción con alcohol butílico cuando se emplea el fotómetro. En los casos en que se emplee la extracción con este alcohol, purificar el reactivo como se señala en la valoración de la pasteurización (4.3.1.5.1) centrifugar la muestra durante 5 minutos a fin de romper la emulsión y remover el agua suspendida en la capa alcohólica. Después de centrifugar, con una pipeta capilar provista de bulbo de hule, separar todo el alcohol butílico. Filtrar recogiendo el filtrado en la celda del espectrofotómetro y leer a 610 nm.

4.5.8.2 Método visual con escala de patrones

Comparar los colores de las muestras que dan más de 5 unidades con los tubos de color que contienen patrones de fenol (4.3.6.2).

Para obtener resultados cuantitativos en aquellos casos en que haya variaciones entre 0,5 y 5 unidades de color hacer la extracción con alcohol butílico, agregando 5 ml de alcohol e invirtiendo lentamente varias veces; centrifugar como se señala en el método anterior (4.3.6.2) si fuera necesario, para aumentar la claridad de la capa alcohólica y comparar el color con los patrones tratados en igual forma (4.3.6.2).

4.5.8.3 En aquellas pruebas en las que durante el desarrollo de color se obtengan resultados fuertemente positivos (por ejemplo con 20 unidades o más) y en las cuales no sean suficientes 4 gotas del reactivo B.Q.C. (4.3.3) para reaccionar con todo el fenol, hacer diluciones colocando nuevos tubos con volúmenes conocidos que se diluyen a 10 ml con la solución reguladora de dilución de color (4.3.1.3) y agregar 2 o más gotas del reactivo B.Q.C. (4.3.3). En cada una de estas pruebas diluir el testigo y tratarlo directamente. De la misma manera en aquellos casos en los que estas nuevas diluciones produzcan nuevamente reacciones fuertemente positivas, todavía será necesario volver a preparar otras diluciones más, hasta que el color quede comprendido entre los de la escala o de la curva del fotómetro.

Para hacer la lectura final, dejar transcurrir 30 minutos a partir del momento de la adición del reactivo B.Q.C. (4.3.3). a fin de que se desarrolle totalmente su color. Multiplicar las lecturas de las diluciones por el factor de dilución por 2 en el caso de haber diluido 5 ml; por 10, para aquella dilución inicial 1 + 9 ml y por 50, en caso de una dilución inicial 1:9 ml, seguida de otra de 2:8 ml.

4.5.8.4 Cuando se emplea 1 ml de la muestra y se agregan 11 ml de los reactivos (el volumen total líquido es de 12 ml, usando 5 ml de filtrado) multiplicar el valor de la lectura por la cifra 1,2 a fin de convertir a equivalentes de fenol en 0,5 ml de muestra (cuando se desea, los resultados pueden convertirse en equivalentes de fenol por mililitro multiplicando por 2,4). Los equivalentes de fenol mayores de 2 x 0,5 ml, o 4 x 1,0 ml indican pasteurización deficiente en leche de vaca, bebidas con chocolate, mantequilla y suero de queso; equivalentes de fenol mayores de 1

por 1,5 ml indican pasteurización deficiente en la leche de cabra.

4.5.8.5 Expresión de resultados

Fosfatasa residual _____ U F/ml

5. Inhibidores pruebas cualitativas

5.1 Derivados Clorados

5.1.1 Fundamento

Cuando la muestra es tratada con ácido, se libera el cloro presente, si este cloro se hace reaccionar con yoduro de potasio y solución de almidón se desarrolla un color azul cuya intensidad va a depender de la cantidad de cloro presente.

5.1.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril
- Tubos de ensayo
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Agitadores de vidrio
- Embudos de filtración
- Papel filtro
- Baño de agua a 85 °C
- Baño de hielo

5.1.3 Reactivos

- Yoduro de potasio. Solución al 7% (KI)
- Ácido clorhídrico diluido 1:2. A 100 ml de ácido clorhídrico (HCl) agregar 200 ml de agua.
- Solución de almidón. Suspender 1 g de almidón en un poco de agua fría, homogeneizar y agregarlo a 100 ml de agua hirviendo, agitar hasta disolución completa, enfriar antes de usar. Utilizar solución recientemente preparada. $(C_6H_{10}O_5)_x$

5.1.4 Procedimiento

En un tubo de ensayo poner 5 ml de leche y agregarle 1,5 ml de solución de yoduro de potasio al 7%, agregar 4 ml de HCl diluido y mezclar perfectamente con una varilla de vidrio. Colocar los tubos en un baño de agua a 85°C y dejar reposar 10 minutos. Sacar los tubos y enfriarlos rápidamente colocándolos en baño de hielo. Filtrar, recoger el filtrado en un tubo de ensayo. Agregar al filtrado 0,5 - 1,0 de solución de almidón.

La aparición de un color amarillo indica la presencia de cloro teniendo varias tonalidades amarillas de acuerdo con la concentración de cloro presente.

La aparición de un color azul intenso hasta morado indica la presencia de yodo.

5.2 Derivados Clorados (método volumétrico)

5.2.1 Fundamento

Cuando una muestra es tratada con un ácido, se libera el cloro presente. Si ese cloro es tratado sobre yoduro de potasio, el yodo liberado podrá ser cuantificado por titulación con tiosulfato de sodio, indicando así la cantidad de cloro activo presente en la muestra.

5.2.2 Material y Equipo

- Todo el material y equipo debe estar estéril.
- Pipetas volumétricas de 10 y 20 ml
- Matraz de yodo de 250 ml
- Probeta de 100 ml
- Bureta de 10 ml o microbureta
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg

5.2.3 Reactivos

- Solución de tiosulfato de sodio 0.1 N ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$)
- Solución de yoduro de potasio al 10% (KI)
- Solución de almidón al 0.5% ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_x
- Ácido acético G. R. (CH_3COOH)

5.2.4 Procedimiento

Medir 10 ml de la muestra sellada en un matraz de yodo. Agregar 10 ml de KI y 5 ml de ácido acético. Agitar perfectamente (un color amarillo indicará la presencia de cloro). Titular inmediatamente con tiosulfato de sodio, hasta obtener un color amarillo pálido. Agregar 1 ml de solución de almidón y continuar la titulación hasta que desaparezca el color azul y la solución permanezca incolora por 30 segundos. Si la solución después de añadir el ácido tiene un color amarillo muy pálido, agregar inmediatamente el indicador y titular.

Titular simultáneamente un blanco utilizando 10 ml de agua destilada, agregar todos los reactivos. Si aparece un color azul, titular con tiosulfato de sodio.

5.2.5 Cálculos

$$\text{g/l de cloro} = \frac{(A - B) \times N \times 35,5}{M}$$

En donde:

A = Volumen de tiosulfato de sodio gastado para titular la muestra

B = Volumen de tiosulfato de sodio gastado para titular el blanco

N = Normalidad del tiosulfato de sodio

M = ml de muestra tomados

5.3 Sales cuaternarias de amonio

5.3.1 Fundamento

Cuando se hace reaccionar el ión cuaternario de amonio en medio alcalino con un indicador (anaranjado de metilo) se forma un complejo que es extraído con cloroformo, el cual en medio ácido da un color magenta.

5.3.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril
- Matraces Erlenmeyer de 125 ml
- Mortero de porcelana de 10 cm de diámetro
- Embudos de filtración
- Tubos de ensayo
- Pipetas graduadas de 10 ml

5.3.3 Reactivos

- Anaranjado de metilo. Solución acuosa al 0,15% $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}=\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$.
- Hidróxido de sodio (solución acuosa). Disolver 66,5 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. (NaOH)
- Cloroformo (CHCl_3)
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)

5.3.4 Procedimiento

Colocar 25 ml de leche en un matraz Erlenmeyer, agregar 0,5 ml de solución acuosa de anaranjado de metilo, 1 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio y 20 ml de cloroformo, agitar 3 minutos.

Pasar la emulsión resultante a un mortero al que previamente se le han agregado 50 g de sulfato de sodio anhidro, triturar perfectamente, agregar 20 ml de cloroformo y filtrar. Al filtrado agregar 5 ml de ácido clorhídrico 2 N y agitar.

Un color magenta cereza en la capa acuosa es la prueba positiva de cantidades mayores de 1 mg/kg de sales cuaternarias de amonio.

5.4 Oxidante

5.4.1 Fundamento

La hemoglobina actúa como catalizador en la oxidación de éter de petróleo por el peróxido de hidrógeno, produciéndose una coloración azul cuando la leche ha sido adicionada de agua oxigenada.

5.4.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril
- Papel filtro
- Pipetas graduadas de 5 ml

5.4.3 Reactivos

- Solución saturada de éter de petróleo en ácido acético ($(C_2H_5)_2O$ $C_2H_4O_2$)
- Hemoglobina diluida en agua (se utiliza sangre hemolizada con agua 1:2)

5.4.4 Procedimiento

Colocar sobre un papel filtro una gota de leche, en el mismo sitio agregar una gota de solución de éter de petróleo y una gota de hemoglobina diluida.

En presencia de agua oxigenada se producirá un color azul.

6. Prueba de inhibidores bacterianos (Método cualitativo utilizando discos de papel)

6.1 Fundamento

Poner de manifiesto los halos de inhibición que se forman en discos de papel (6.2) con la muestra y se depositan en la superficie de un medio de cultivo sólido en caja de petri el cual está inoculado con esporas de *Bacillus subtilis*.

6.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril
- Autoclave con termómetro y manómetro
- Centrífuga
- Pinzas de disección de acero inoxidable terminados en punta
- Incubadora con termostato que evite variaciones superiores a 0,5 °C
- Botella de Roux
- Tubos de ensayo de 13 X 100 mm
- Cajas petri de 100 X 15 mm
- Pipetas bacteriológicas de 1 y 10 ml
- Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro con absorción elevada (147 W o 147 E)
- Perlas de vidrio

6.3 Reactivos

- Solución salina al 0,9%
- Medio para antibióticos
- Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot H_2O$)
- Cloruro de manganeso ($MnCl_2$)

6.3.1 Preparación de reactivos

6.3.1.1 Medio para antibióticos

Fórmula

Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3,0 g
Digerido pancreático de caseína	4,0 g

Digerido pancreático de gelatina	6,0 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,000,0 ml
pH final:	6,6 ± 0,1

NOTA: Pueden emplearse medios de cultivo comerciales conforme a las instrucciones del fabricante.

6.3.1.2 Preparación y esterilización

Pesar los ingredientes y suspenderlos en 200 ml de agua (en un matraz de 2,000 ml de capacidad). Una vez embebido el polvo, añadir 400 ml más de agua y calentar suavemente, agitando con frecuencia. Al empezar la ebullición, añadir 400 ml de agua caliente para bajar la espuma formada y evitar que el medio se derrame; ebullición por dos minutos más y retirar el medio del calor. Ajustar el pH, distribuirlo en porciones de 100 ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapones de gasa y tapados con papel aluminio. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

El aspecto del medio al salir del autoclave debe ser claro, de color amarillo brillante.

Sacar los medios del autoclave hasta que alcance una temperatura de 55 ± 5 °C.

Sumergir el medio en un baño de agua a 45 ± 1 °C para mantenerlo fundido (no mantenerlos más de tres horas a esta temperatura).

Distribuir las cajas en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa y bien nivelada.

Marcar las cajas con los datos necesarios para su identificación: número de muestra, fecha, dilución y medio empleado.

6.3.1.2.1 Solución salina al 0,9% en agua

Pesar 0,9 g de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y añadir 100 ml de agua destilada.

Esterilizar según las indicaciones anteriores, (6.3.1.2).

6.3.1.2.2 Solución al 1% de cloruro de manganeso en agua

Pesar 1 g de cloruro de manganeso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añaden 100 ml de agua destilada.

Esterilizar según las indicaciones anteriores, (6.3.1.2)

6.4 Preparación de esporas de *Bacillus subtilis*

Sembrar el microorganismo en 3 tubos con medio para antibióticos. Incubar los tubos a 37°C de 18 a 24 horas.

Suspender el crecimiento sobre la superficie de los tubos con 3 ml de solución salina estéril al 0,9% y pasar a una botella de Roux, conteniendo 300 ml de medio para antibióticos, al cual se le agregan 300 mg de sulfato de manganeso (con una molécula de agua) o 0,4 ml por litro de una solución al 1% de cloruro de manganeso. Distribuir la suspensión de microorganismos sobre la superficie de la botella.

Incubar a 37 °C, durante 5 días.

Suspender el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de solución salina estéril con la ayuda de perlas de vidrio.

Centrifugar y decantar el líquido sobrenadante.

Resuspender el sedimento con 50 ml de solución salina estéril.

Calentar la suspensión durante 30 minutos a 70°C. Conservar la suspensión de esporas en refrigeración.

Esta suspensión es estable durante varios meses en refrigeración.

6.5 Procedimiento

Fundir el medio para antibióticos, enfriarlo y conservarlo a 50 °C en baño maría.

Inocular un frasco que contenga 100 ml de medio con la suspensión de esporas, agitando cuidadosamente para evitar la formación de espuma.

La concentración óptima de esporas que se va a agregar al agar debe determinarse previamente, ensayando varias diluciones.

Elegir la dilución que proporcione buen desarrollo de colonias y zonas de inhibición bien definidas (haciendo la prueba con discos estándar que contengan 0,05 y 0,5 unidades de penicilina/ml)

Vaciar 10 ml de medio inoculado en cajas de petri estériles y dejar solidificar.

Calentar 2 ml de la muestra de prueba a 82,2 °C de 2 a 5 min (para evitar reacciones positivas falsas debido a las sustancias inhibidoras naturales de la leche cruda, que la pasteurización disminuye, pero que no elimina por completo). Enfriar hasta temperatura ambiente.

Utilizando las pinzas de disección flameadas, sumergir un disco de papel en la leche.

Dejar que la leche sature el disco, evitando que haya un exceso.

Colocar el disco con la parte plana hacia abajo sobre la superficie del agar.

Incubar las cajas en posición invertida a 35 °C de 18 a 24h.

Observar las placas y tomar como positivos los discos que muestren un halo de inhibición.

6.6 Interpretación de los resultados

La presencia de inhibidores bacterianos en la leche invalida por completo los resultados de las cuentas bacterianas. En este grupo se incluyen germicidas y antibióticos.

La prueba descrita es más específica para antibióticos residuales, y su presencia puede indicar que la leche fue obtenida de animales enfermos, sometidos a tratamientos con antibióticos, o bien que alguno de estos productos fue adicionado, con el objeto de evitar la proliferación microbiana, enmascarando prácticas inadecuadas de higiene.

7. Determinación de las vitaminas A y E por cromatografía líquida de alta presión (HPLC en fase normal)

7.1 Fundamento

Saponificación de la muestra; extracción de los compuestos insaponificables; evaporación y redisolución en n-hexano e inyección en la columna en fase normal

7.2 Material y Equipo

- Todo el material utilizado debe estar estéril
- Instalación HPLC isocrática
- Uno o dos registradores
- Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg
- Balanza de precisión, con capacidad de 1600 g lectura 0,01 g
- Estufa de laboratorio (para productos con almidón)
- Baño maría con agitadores magnéticos, 4 plazas
- Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño
- Matraces aforados, vidrio marrón, tapón de vidrio de 50 y 100 ml
- Matraz de fondo plano, cuello corto, 250 ml
- Matraces, en forma de pera, vidrio marrón de 10 y 500 ml
- Embudo de separación cónico, vidrio marrón, con llave de 500 ml
- Embudo, vidrio marrón, diámetro 12 cm
- Tapones huecos hexagonales, vidrio marrón
- Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 mm
- Alargadera para introducción de gas
- Ampolleta de vidrio marrón de 5 ml
- Filtro plisado mediano con diámetro de 18,5 cm
- Pipetas aforadas, con una marca, de 3 y 5 ml
- Jeringuillas de 1 y 5 ml
- Aguja para jeringuillas
- Cilindro para gas comprimido, nitrógeno

- Monodetector para gas comprimido, N₂
- Filtro de 0,45 µ de diámetro
- Columna de 5 µ, 4,6 X 250
- Aparato de filtración
- Filtro 0,5 µ

7.3 Reactivos

- Retinol (vitamina A) cristalizada (C₂₀H₃₀O)
- DL-alfa-tocoferol (vitamina E) para fines bioquímicos (C₂₉H₅₀O₂)
- Hidróxido de potasio en lentejas para análisis (KOH)
- Alcohol etílico absoluto, para análisis (C₂H₅OH)
- Hidroquinona (C₆H₄(OH)₂)
- Éter de petróleo para análisis intervalo de ebullición 40 - 60°C
- Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador ((C₆H₄OH)₂COC₆H₄CO) diastasa (para productos de almidón)
- 2-propanol ((CH₃)₂CHOH)
- n-hexano (CH₃(CH₂)₄CH₃)
- Sulfato de sodio anhidro para análisis (Na₂SO₄)
- Nitrógeno (N₂)
- Ácido ascórbico (C₆H₈O₆)

7.3.1 Fase móvil para HPLC, 2-propanol al 1% en n-hexano.

Degasificar el n-hexano bajo presión reducida y pasar a través de un filtro. Mezclar 10 ml de 2-propanol con 990 ml de n-hexano degasificado.

7.3.2 Solución patrón de vitamina A

7.3.2.1 Solución concentrada

Justo antes del uso, pesar en un matraz aforado de 100 ml aproximadamente 15 mg de retinol cristalizado (A - OH) y tomar el peso exacto, disolver en n-hexano y llevar a volumen con el mismo disolvente (= solución de aproximadamente 500 UI/ml).

Esta solución permanece estable 1 semana a 4°C.

7.3.2.2 Solución para HPLC

Diluir 5 ml de solución 7.3.2.1 a 50 ml con el mismo disolvente para obtener una solución de aproximadamente 50 UI/ml

Medir la extinción (E) a 325 nm y determinar la concentración de la vitamina A-OH, en UI/ml, según:

1%

E_{1cm} en n-hexano = 1815

Para 1 UI A-OH/ml E = 0,0545

Si el contenido es inferior a 85 % del valor teórico, no puede utilizarse esta solución patrón, es necesaria una nueva preparación. Si se obtiene otro valor debe considerarse en los cálculos finales.

NOTA: La vitamina A-OH (A - alcohol) se oxida con gran rapidez y es muy sensible a la luz. Al abrir una nueva ampolleta de vitamina A - alcohol cristalizada, distribuir el contenido a razón de 50 mg en pequeñas ampolletas marrones. Trabajar en una cámara oscura. Las ampolletas deben cerrarse inmediatamente bajo nitrógeno.

7.3.3 Solución patrón de vitamina E

En un matraz aforado de 100 ml, pesar exactamente 100 mg de alfa- tocoferol (E-OH), disolver en n-hexano y llevar al volumen con el mismo disolvente.

Diluir esta solución 5 veces con el mismo disolvente para obtener una solución de 0,2 mg/ml. Esta solución permanece estable 1 semana a 4°C.

7.4 Procedimiento

NOTAS: Las vitaminas A y E son sensibles a la luz. Utilizar material de vidrio marrón, o proteger el material corriente con papel aluminio.

Efectuar todas las evaporaciones de disolventes bajo presión reducida a una temperatura máxima de 40°C. No debe evaporarse a seco. Romper el vacío introduciendo nitrógeno en el sistema. Evaporar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

7.4.1 Toma de ensayo

Mezclar o moler la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Pesar, con una precisión de 10 mg, una toma de ensayo que contenga 100 - 300 UI de vitamina A y 0,5 - 1 mg de vitamina E, lo que corresponde en general a 10 g.

7.4.1.1 Productos con almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 10% de su peso de diastasa. Añadir máximo 30 ml de agua destilada a 45-50°C. Mezclar bien para obtener una suspensión homogénea. Eliminar el aire del matraz mediante nitrógeno, tapar y colocar el matraz durante 30 minutos en una estufa a 45 °C.

7.4.1.2 Productos sin almidón

En un matraz redondo de fondo plano de 250 ml con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con máximo 30 ml de agua destilada a 45 - 50 °C.

7.4.2 Saponificación

Añadir 7 g de hidróxido de potasio grado analítico en el matraz (7.3.3.1 o 7.3.1.2), y mezclar para disolver. A continuación añadir 60 ml de alcohol absoluto y 0,5 g de ácido ascórbico o hidroquinona.

Montar sobre un sistema de reflujo, introducir una ligera corriente de gas nitrógeno y calentar durante 30 minutos en un baño maría ebullición provisto de agitadores magnéticos.

NOTA: Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

7.4.3 Extracción del insaponificable

Una vez terminada la saponificación, enfriar el matraz a temperatura ambiente y trasvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 ml.

Enjuagar con máximo 30 ml de agua fría en 3 porciones de 10 ml que se añaden al contenido del embudo de separación. Evitar un exceso de agua, ya que favorece la formación de emulsiones.

Enseguida enjuagar el matraz con 50 ml de éter de petróleo (rango de 40-60°C) en varias porciones que se añaden al embudo de separación. Extraer las vitaminas A y E agitando ligeramente. Dejar separar las fases. Vaciar la fase acuosa a otro embudo de separación de 500 ml. Recoger la fase orgánica en un tercer embudo de separación de 500 ml.

Efectuar esta extracción 5 veces en total. Haciendo las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

Lavar la solución orgánica con porciones de 100 ml de agua adicionándola por las paredes del embudo, sin agitar, hasta que el agua de lavado ya no dé reacción coloreada con fenoltaleína. Después del último lavado, esperar al menos 15 minutos antes de vaciar la fase acuosa.

Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhidro o en un papel separador de fases tipo 1 PS, y recoger el filtrado en un matraz en forma de pera de 500 ml, sin dejar secar el filtro. Y al final enjuagar el filtro con 50 ml de éter de petróleo.

Evaporar el disolvente bajo presión reducida en un rotavapor a 40°C, y eliminar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

Disolver el residuo en 3 ml de la fase móvil (7.2.1) y filtrar la solución inmediatamente a través de un filtro de 0,45 µ de tamaño de poro y adecuado para solventes orgánicos, recoger el filtrado en un matraz. El filtrado debe ser límpido.

La solución está lista para la cromatografía.

7.5 Cromatografía

Condiciones:

Columnna: Spherisorb Sílice, 5 µm, 4,6 X 250 mm

Loop de inyección: 20 µl

Fase móvil: 1% 2-propanol en n-hexano (7.3.1)

Caudal: 2 ml/min

Detector: ya sea:

espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 292 nm, 0,2 AUFS

ya sea:

espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 325 nm, 0,2 AUFS, para la vitamina A, en serie con espectrofluorímetro para vitamina E.

Ex: 294 nm, Em: 236 nm.

Registrador: 10 mm/min

Inyectar primero 20 µl de solución patrón de vitamina E (7.3.3) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 8 min. En seguida inyectar 20 µl de extracto obtenido bajo 7.4.3.

7.6 Cálculo, expresión e interpretación de los resultados

7.6.1 Evaluación

Identificar los picos de las vitaminas A y E en el cromatograma de la muestra mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución de la muestra y de la solución patrón correspondiente.

El contenido en vitamina A, expresado en Unidades Internacionales por 100 g de producto, y el contenido en vitamina E, expresado en mg por 100 g de producto, es igual a:

$$\frac{h_p \times C \times V \times 100}{h_s \times m}$$

En donde:

m = toma de ensayo, en g.

h_p = altura del pico de la muestra, en mm

h_s = altura del pico de la solución patrón, en mm

C = concentración de la solución patrón inyectada, en UI/ml para la vitamina A, y en mg/ml para la vitamina E

V = volumen, en ml, en el cual ha sido diluido el residuo antes de la cromatografía (7.3.3)

7.6.2 Límite de detección de acuerdo a la sensibilidad del equipo.

1 mg de D-α- tocoferil acetato es = 1 UI de vit. E

1 mg de DL- α - tocoferol = 1,1 UI de vit E
Vitamina A: aproximadamente 50 UI/ 100 g
Vitamina E: espectrofotometría: aprox. 0,5 mg/100 g
fluorimetría: aprox. 0,2 mg/100 g

7.6.3 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10 % de la media entre ambos resultados.

Cuando las vitaminas han sido añadidas por mezcla en seco, la repetibilidad está fuertemente influida por el grado de homogeneidad del producto.

NOTA: Para la determinación de vitamina A, en leche seguir la metodología anterior leyendo con el detector de UV a 325 nm.

La determinación de vitamina A y E puede hacerse de manera conjunta contando con un detector de UV programable o con detector de UV y un fluorómetro. Si no se cuenta con detector de UV programable o fluorómetro, inyectar dos veces la muestra para determinar las vitaminas por separado.

8. Determinación de aflatoxinas M₁ en leche fluida y leche en polvo por cromatografía de capa fina.

8.1 Fundamento

La aflatoxina M₁ es un metabolito hidroxilado de la aflatoxina B₁, secretado en la leche de mamíferos que por alguna causa han consumido aflatoxina B₁.

La aflatoxina se extrae de la muestra con cloroformo, el extracto se purifica por medio de cromatografía en columna y posteriormente se identifica y cuantifica por cromatografía de capa fina, comparándose contra un estándar.

8.2 Preparación de la muestra

8.2.1 Leche fluida

En un embudo de separación de 250 ml, poner 50 ml de leche fluida a temperatura ambiente, adicionar 10 ml de la solución salina y 120 ml de cloroformo, agitar por 1 min. dejar reposar 2 min; para que las capas se separen (si las capas no se separan centrifugar la mezcla para romper la emulsión). Pasar la capa inferior de cloroformo a un matraz de 125 ml, adicionar 10 g de sulfato de sodio, agitar ocasionalmente durante 3 min. y filtrar a través de papel filtro en un matraz volumétrico de 100 ml. Guardar el filtrado, para la columna de cromatografía. Medir cuidadosamente el volumen del filtrado.

8.2.2 Leche en polvo

En un embudo de separación de 250 ml reconstituir 5 g de leche en polvo con 50

ml de agua, con agitación, agregar la solución salina y el cloroformo como en el caso de la leche fluida. En caso de formarse emulsión, romper ésta por centrifugación o bien sustituir los 50 ml de agua y la solución salina por 60 ml de solución de urea 6 M (360 g de urea por litro de agua) y continuar como se indicó en el caso de la leche fluida.

8.3 Material y Equipo.

Todo el material utilizado debe estar descontaminado, conforme al Apéndice Informativo A de este ordenamiento.

- Agitador con acción de muñeca (tipo Vortex)
- Balanza analítica con sensibilidad de 0,001 mg
- Baño de vapor
- Cámara de cromatografía con tapa para placas de 20 x 20 cm.
- Columna cromatográfica de 2,2 cm de diámetro por 30,0 cm de longitud con llave de teflón y reservorio de 250 ml
- Densitómetro con accesorios para cromatografía de capa fina
- Embudos de separación de 250 ml
- Espectrofotómetro con graficador con capacidad para leer de 200 a 400 nm.
- Celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz
- Frascos viales transparentes con tapón de rosca de polietileno de 10 ml de capacidad.
- Estufa de secado
- Gabinete Chormato-Vue, equipado con lámpara de luz ultravioleta de onda larga de 15 watts o lámpara de luz ultravioleta de onda larga de 15 watts (observar en oscuridad usando lentes protectores).
- Matraces Erlenmeyer de 125 y 500 ml con tapón de vidrio esmerilado
- Microjeringas de 10 ml.
- Placas para cromatografía de capa fina de 10 x 10 o 20 x 20 cm recubiertas con una capa de 0,25-0,5 mm de sílica gel secados durante 1 h a 105 °C.
- Porta placas
- Aplicador con plantilla para montar las placas
- Plantilla de manchas
- Papel aluminio
- Papel filtro para filtración rápida resistente a fuerte filtración
- Material común de laboratorio.

8.4 Reactivos

- Agua destilada
- Ácido acético grado ACS ^{10*} C₂H₄O₂
- Acetona grado ACS C₃H₆O
- Acetonitrilo grado ACS CH₃CN

- Benceno grado ACS C_6H_6
- Cloroformo grado ACS CH_3Cl
- Éter etílico grado ACS C_4H_{10}
- Hexano grado ACS C_6H_{14} con punto de ebullición 68-69 °C
- Isopropanol grado ACS C_3H_8O
- Tolueno grado ACS C_7H_8
- Solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) grado ACS (aproximadamente 40 g en 100 ml de agua)
- Sulfato de sodio anhidro granular Na_2SO_4 grado ACS
- Estándar de referencia de Aflatoxina M_1 como se establecen en este método.

8.4.1 Sílica gel para cromatografía en columna de 0,063 a 0,2 mm (70-230 mallas) equivalente.

8.4.1.1 Preparación:

Agitar con metanol por 1 h, filtrar y tratar de manera similar con cloroformo.

Activarla y tratarla de la siguiente manera:

En una cápsula de porcelana poner alrededor de 150 g de sílica gel y secarla en el horno durante 1 h. a una temperatura de 105 a 110 °C, retirar la cápsula de porcelana del horno y transferir la sílica a un matraz Erlenmeyer de 500 ml y taparlo bien, permitir que la sílica gel alcance la temperatura ambiente; cuando se haya enfriado, pesar 100 g de sílica gel del matraz y con ayuda de un embudo limpio vaciarla a otro matraz Erlenmeyer de 500 ml y agregar 1 ml de agua destilada utilizando una pipeta; tapar y agitar.

Mezclar durante 1 h con un agitador de muñeca, agitar vigorosamente a mano durante 1 min. repitiendo este paso cada 15 min. durante 1 h.

Permitir que la sílica gel repose por un mínimo de 15 h antes de usarse, almacenarla en frascos de plástico con tapa de rosca perfectamente sellados. El frasco debe conservarse en un desecador hasta el momento de su uso.

Si la sílica gel no se usa en un período máximo de 2 semanas existe la posibilidad de que se humedezca y habrá que activarla nuevamente, siguiendo el mismo procedimiento.

8.4.2 Preparación de estándares de aflatoxina M_1

8.4.2.1 Ácido sulfúrico H_2SO_4 0,018 N - Disolver 1 ml. de ácido sulfúrico en 2 l de agua.

8.4.2.2 Solución estándar de Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$

8.4.2.2.1 Preparación:

Aproximadamente con una concentración de 0,25 mM.

Pesar exactamente 78 mg, de dicromato de potasio (estándar primario) y disolver en un matraz volumétrico de 1 l con solución 0,018 N de ácido sulfúrico.

Calcular la molaridad (peso molecular de $K_2Cr_2O_7 = 294,2$).

Aproximadamente con una concentración de 0,125 mM.

En un matraz volumétrico de 50 ml diluir 25 ml de la solución 0,25 mM de dicromato de potasio con solución 0,018 N de ácido sulfúrico.

Aproximadamente con una concentración de 0,0625 mM.

En un matraz volumétrico de 50 ml diluir 25 ml de la solución 0,125 mM de dicromato de potasio con solución 0,018 N de ácido sulfúrico.

8.5 Calibración de espectrofotómetro:

8.5.1 Determinar la absorbancia (A) de las tres soluciones $K_2Cr_2O_7$ en ácido sulfúrico a su máximo de absorción cerca de 350 nm usando como blanco la solución 0,018 N de ácido sulfúrico.

8.5.2 Calcular la absorbitividad molar (E) de cada concentración con la siguiente fórmula:

$$\text{concentración E} = \frac{A \times 1000}{\text{Concentración en mM}}$$

Si los tres valores varían, checar la técnica o el instrumento, promediar los 3 valores para obtener el valor de E.

Determinar el factor de corrección (CF) para cada instrumento y celdas en particular sustituyendo en la siguiente, ecuación:

$$CF = \frac{3160}{E}$$

Donde: 3160 = Valor de E de las soluciones de $K_2Cr_2O_7$

Si CF es $< 0,95$ o $> 1,05$ checar el instrumento o técnicas, para determinar o eliminar la causa, (usar el mismo juego de celdas en la calibración y determinación de la pureza).

8.5.3 Manejo del estándar de aflatoxina que puede presentarse como:

Película seca o cristales.

Al recipiente que contenga la aflatoxina seca M, añadir un volumen determinado de Benceno-acetonitrilo (9+1) para obtener una concentración de 8 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

Usar como guía el peso rotulado en el recipiente.

Agitar vigorosamente durante un minuto con agitador de muñeca y transferir al recipiente apropiado.

Realizar las diluciones pertinentes para obtener una concentración 0,25 µg/ml M, en Benceno-acetonitrilo (9+1) para utilizarlo tanto en el método por Densitometría como el análisis visual.

Envolver los viales (estándar primario y diluciones de trabajo) con papel de aluminio para evitar su exposición a la luz.

Conservar los viales en refrigeración en recipientes irrompibles.

Los estándares presentados en películas, secos y contenidos en recipientes de vidrio no se recuperan totalmente a causa de la absorción. Un contacto continuo con el solvente puede dar disolución muy lenta. No trasvasar la aflatoxina seca para pesarla o para otros propósitos, cuando no se tengan facilidades para prevenir la diseminación de las aflatoxinas en los alrededores debido a las cargas electrostáticas sobre las partículas.

8.6 Estándares de aflatoxinas en solución:

Transferir la solución a un recipiente adecuado para ajustar la concentración a 8-10 µg/ml y continuar como se explicó anteriormente.

8.7 Determinación de la concentración de aflatoxina:

Graficar el espectro de UV de la solución de aflatoxina de 330 a 370 nm, contra Benceno-acetonitrilo (9+1).

Determinar la concentración de la solución de aflatoxina midiendo la absorbancia (A) a la longitud de onda máxima absorción más cercana a 350 nm y utilizar la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de aflatoxina/ ml} = \frac{(A \times M \times W \times V \times 1000 \times C \times F)}{E}$$

En donde:

CF= Factor de corrección obtenida con anterioridad.

MW= Para aflatoxina M₁= 328

E = Para aflatoxina M₁= 19850

Regresar la solución de aflatoxina al frasco original ya que se producen fotoproductos durante una exposición normal a la luz UV durante la medición de A.

8.8 Purificación del extracto por cromatografía en columna.

8.8.1 Preparación de la columna cromatográfica.

Llenar el tubo de la columna con cloroformo hasta la mitad. Cuidadosamente añadir 2 g de sílica gel activada y 3 o 4 ml de cloroformo; con una varilla remover suavemente el líquido para dispersar la sílica gel, cuando ésta se haya asentado,

drenar el cloroformo y lavar las paredes interiores de la columna con más cloroformo.

Adicionar lentamente 2 g de sulfato de sodio anhidro sobre la sílica gel para cubrir la columna, drenar el exceso de cloroformo hasta que el nivel del líquido quede aproximadamente 1 cm por arriba de la columna empacada.

Adicionar en porciones el extracto filtrado de la muestra y permitir que la solución drene a través de la columna por gravedad; si el flujo es lento agitar suavemente la capa de sulfato de sodio.

Enjuagar varias veces con cloroformo el matraz que contenía el filtrado y agregar estos enjuagues a la columna, cuando el nivel del líquido quede ligeramente encima de la capa de sulfato de sodio enjuagar las paredes de la columna con cloroformo y dejar que drene en forma similar.

Lavar la columna con 25 ml de una mezcla de Tolueno-ácido acético (9+1), después lavar con 25 ml de hexano y posteriormente con 25 ml de una mezcla hexano-eter-acetonitrilo (5+3+2) y desechar los lavados.

Eluir la aflatoxina M₁ con 40 ml de cloroformo-acetona (4+1), recibir el eluato y evaporarlo casi a sequedad en vacío o en un baño de vapor. Transferir cuantitativamente el extracto concentrado con enjuagues de cloroformo a un vial con tapón de rosca de polietileno, evaporar el contenido del vial casi a sequedad en un baño maría, evitando que se caliente o que se seque totalmente y almacenarlo en refrigeración si no se va a emplear inmediatamente.

8.8.2 Cromatografía de capa fina.

8.8.2.1 Activación de las placas.

Activar las placas de sílica gel antes de usarlas, calentarlas durante una hora en un horno a 110°C, enfriar la placa en un desecador hasta temperatura ambiente.

Al extracto de la muestra contenido en el vial adicionar 100 y 1 de la mezcla benceno-acetonitrilo (9+1), tapar el vial y mezclar vigorosamente durante 1 min. de preferencia con un agitador de muñeca.

El volumen obtenido es suficiente para el análisis visual o el densitométrico pero no para ambos. Después de aplicar la muestra en la placa, guardar el excedente en refrigeración.

8.8.2.2 Aplicación de muestras y estándares para análisis visual.

En una superficie plana, colocar la placa de sílica gel y encima de ésta la plantilla de aplicación de manchas dejar una distancia de aproximadamente 1 cm del borde inferior de la placa. Apoyándose en la plantilla de aplicación, depositar en la placa con ayuda de una microjeringa alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 µl del estándar de Aflatoxina M₁ (0,25 µg/ml), tener cuidado que la microjeringa no toque la placa

con cada porción.

Con un lápiz marcar suavemente a qué concentración del estándar corresponde cada mancha. Todas las manchas deben ser pequeñas y de tamaño uniforme, para lograrlo se aplicarán gotitas permitiendo que el solvente se evapore antes de aplicar la siguiente gota. Entre cada punto de aplicación debe existir una distancia mínima de 1 cm. En la misma forma y en la misma placa aplicar alícuotas de 20 µl de la muestra.

PRECAUCIÓN. Se sugiere usar diferentes microjeringas para aplicar estándares y muestras.

8.8.2.3 Desarrollo del cromatograma:

En una cámara de desarrollo de cromatografía depositar el solvente de desarrollo que puede ser:

Cloroformo - Acetona - Isopropanol (87+10+3)

Éter etílico - Metanol - Agua (95+4+1)

Éter - Hexano - Metanol - Agua - (85+10+4+1)

Desarrollar la placa hasta aproximadamente una altura de 12 cm para las placas de 20 x 20 cm y una altura de 8 cm para la de 10 x 10 cm.

Es conveniente que la cámara de desarrollo se prepare por lo menos media hora antes de usarse, con el propósito de obtener una buena saturación. La cámara debe estar en una superficie sin desniveles y no debe moverse durante el proceso para asegurar el desarrollo uniforme del cromatograma. El nivel del solvente de desarrollo debe estar por debajo del nivel de la línea en la que se depositaron las manchas en la placa.

La placa se debe introducir cuidadosamente dentro de la cámara tapándola con rapidez. Se aconseja sellarla con grasa de silicona.

Cuando el solvente ha ascendido hasta el frente previsto, retirar la placa y colocarla en una superficie plana debajo de una campana de extracción.

8.9 Identificación de la aflatoxina.

Colocar la placa bajo la luz UV de onda larga en la oscuridad o dentro del gabinete de Chromato-Vue. Observar las manchas y comparar su color e intensidad con las manchas de los estándares.

Cálculos:

$$\mu\text{g/kg} = \frac{S \times Y \times V}{X \times W}$$

En donde:

S = μl de estándar de Aflatoxina M_1 aplicados en la mancha contra la cual se comparó la muestra.

Y = Concentración del estándar de Aflatoxina M_1 en $\mu\text{g/ml}$

V = μg de dilución final del extracto de la muestra

X = μg del extracto de la muestra cuya mancha es de igual intensidad que S.

W = g de la muestra aplicados a la columna. En este caso se calcula así:

$$W = \frac{\text{Volumen o peso original de la muestra} \times \text{volumen del filtrado}}{120}$$

8.10 Análisis por densitometría

Sobre una placa de cromatografía de capa fina colocar dos manchas de dos alícuotas de 20 μl del extracto de la muestra y manchas de 5, 5 y 10 μl del estándar de aflatoxina M_1 a una concentración de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y desarrollarla como se indicó anteriormente.

Con el densitómetro seguir las instrucciones del fabricante, realizar el barrido de la placa irradiando con una fuente de 365 nm y observar la emisión a 420-460 nm.

Calcular la concentración de Aflatoxina M_1 como sigue:

$$\mu\text{g/kg} = \frac{(B \times Y \times S \times V)}{(Z \times X \times W)}$$

Donde:

B = Promedio del área de los picos obtenidos con las alícuotas de la muestra.

Y = Concentración del estándar de Aflatoxina M_1 en $\mu\text{g/ml}$.

S = Volumen en μl del estándar de Aflatoxina M_1 aplicados en la placa.

V = Dilución final de la muestra extraída (μl).

Z = Promedio del área de los picos obtenidos en las alícuotas del estándar.

X = Volumen en μl de la muestra extraída aplicados en la placa.

W = g de muestra presentes en el extracto final.

APÉNDICE INFORMATIVO A

A. PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO Y ÁREA DE TRABAJO PARA LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

1. Objetivo

Por la naturaleza y potenciabilidades tóxicas de las Aflatoxinas es importante establecer directrices para la descontaminación del área de trabajo, material y equipo utilizados así como los procedimientos a seguir para neutralizar derrames y remanentes de extractos de las muestras.

El trabajo de limpieza y descontaminación será realizado por personal capacitado y que cuente con equipo protector como una bata, guantes impermeables y lentes protectores.

2. Descontaminación del material de laboratorio:

Todo el material de vidrio del laboratorio que haya sido utilizado durante el análisis debe sumergirse en una solución de hipoclorito el cual se prepara diluyendo una parte de solución comercial de hipoclorito de sodio o clarasol (con una concentración entre 5 y 6 %) con 10 partes de agua, por ejemplo mezclar 100 ml de blanqueador comercial con 1000 ml de agua.

Después del tratamiento el material debe enjuagarse abundantemente con agua corriente seguido de agua destilada, secar por escurrimiento o en estufa de 90 - 100° C.

3. Descontaminación del área de trabajo:

La superficie de las mesas de trabajo y las paredes en las que pudiera haberse contaminado de leche con aflatoxinas, deben limpiarse con una toalla desechable impregnada en solución de hipoclorito de sodio o solución blanqueadora comercial después de cada sesión.

4. Descontaminación de material desechable:

Todo el material desechable como son las columnas y placas deben sumergirse durante un mínimo de 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio utilizando una parte de blanqueador comercial y diez partes de agua. La solución descontaminadora ya usada debe eliminarse por el drenaje y los materiales desechables tratados deben empacarse en una bolsa de plástico sellada para colocarse en el depósito de desechos.

5. Tratamiento de derrames:

Los derrames de soluciones de aflatoxinas deben tratarse inmediatamente con hipoclorito de sodio o blanqueador doméstico y verterlo directamente del envase, recoger los líquidos con un papel absorbente, el cual también se colocará en una bolsa de plástico.

6. Tratamiento de remanentes de extracto de muestras:

Una vez que se ha separado una alícuota del extracto de la muestra es frecuente que permanezca un remanente del mismo. Estos restos de extractos deben tratarse con una cantidad de blanqueador equivalente a la unidad del volumen del residuo a tratar. Los líquidos resultantes se deben acumular en un recipiente para desechos líquidos y eliminarse en un lugar destinado especialmente para este propósito.

APÉNDICE INFORMATIVO B

B. LISTA DE SUSTANCIAS SANITIZANTES RECOMENDADAS

Categoría	Solución acuosa de:	Concentración máx. del ingrediente activo	Condiciones de empleo
1	Hipoclorito cálcico, sódico o potásico, con o sin bromuro calcio, sódico o potásico.	200 mg/kg de halógeno calculado en cloro	Escurrir después del tratamiento. No precisa aclarado final.
2	Ácidos di y tricloroiso-cianúrico, o sales potásicas o sódicas de estos -- ácidos con o sin bromuro potásico, cálcico o sódico.	100 mg/kg de halógeno calculado en cloro.	Como en 1
3	Yoduro pótasio, p-toluen-sulfocloramida sódica y Lauril sulfato sódico.	25 mg/kg de yodo valorable; el nivel de los componentes no debe superar el mínimo preciso para obtener el efecto funcional deseado.	Como en 1
4	Yodo butoxi-monoéter de etilenglicol + butoximono-éter de propilenglicol + butoximonoéter de polial-quilenglicol, teniendo un punto de niebla de 90-100°C. en solución al 0,5% y un peso molecular medio de 3,300 y monobutiléter de etilenglicol. Monoetil-éter de dietilenglicol se puede adicionar como componente opcional.	25 mg/kg de yodo. Los adyuvantes utilizados con el yodo no deben de superar la cantidad mínima necesaria para obtener el efecto funcional deseado.	Como en 1
5	Yodo, ácido hidroyódico α-(p-monifenil -w-hidroxipolil (oxietileno) (peso molecular medio 748) y/o polioxietilenpolio-xipropileno tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 1,90). Alcohol isopropílico se puede adicionar como componente opcional.	Como en 4	Como en 1
6	Yodo, yoduro de sodio, dioc-tilsulfosuccinato de sodio y polioxietilen - polioxipropileno tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 1,900).	Como en 4	Como en 1
7	Ácido dodecilbencenosulfónico, polioxietilen-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 2,800).	400 mg/kg de ácido dodecil-benceno-sulfónico y 80 mg/kg de polioxietilen-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 2,800).	Estas soluciones se emplean en la limpieza de equipo y utensilios así como en botellas y envases para leche; no precisan aclarado final.*

8	Yodo, butoxi - monoéter de etilen glicol+butoxi-monoéter de propilenglicol+butoxi-mono-éter de polialquilenglicol, con un peso molecular medio mínimo de 2,400, y a -lauril-w-hidroxipoli (oxietileno) con un promedio de 8-9 moles de óxido de etileno y final. un peso molecular medio de 400.	Como en 4	Estas soluciones se emplean en la limpieza del equipo y utensilios, así como de envases de leche y otras bebidas. Como aclarado preliminar se puede utilizar agua a la que se ha añadido esta solución. No se debe emplear en el enjuagado
9	Cloruro de n-alquil-(C12 a C18) bencildimetil-amonio, con un promedio de peso molecular de 351-380 y conteniendo principalmente cadenas de los grupos alquilo con 12 a 16 átomos de carbono, con o sin grupos alquilo de 8 a 10 átomos de carbono, en una proporción máxima del 1%, respecto a los de 12-16. Se puede añadir como componente opcional alcohol isopropílico.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activos	Como en 1
10	Tricloromelamina y lauril sulfato sódico o ácido dodecilbenceno sulfónico. sódico, a un nivel que, no exceda del mínimo requerido para que se presente el efecto funcional deseado o, ácido dodecilbenceno sulfónico en proporción no superior a 400 mg/kg	Tricloromelamina, en cantidad no superior a la necesaria para producir 200 mg/kg de cloro y lauril sulfato	Estas soluciones se emplean en la limpieza de envases para bebidas, excepto leche, así como en la higienización del equipo y utensilios y otros materiales, que puedan contactar con alimentos. No precisan aclarado final.*
11	Volúmenes iguales de cloruro de n-alquil (C12 a C18) cuaternarios activos bencildimetilamonio y cloruro de n-alquil-(C12 a C18) dimetilbencil-amonio, con un peso molecular medio de 384.	200 mg/kg de compuestos de amonio	Estas soluciones se utilizan en el tratamiento de equipo y utensilios, así como las superficies que contactan los alimentos, en establecimientos de comidas públicas. No precisan aclarado final.*
12	Sal sódica del ácido oléico sulfonatado, polioxietileno-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque, con un peso molecular medio de 2,000 y con 27 a 31 moles de polioxipropileno.	200 mg/kg de ácido sulfonatado, sal sódica.	Esta solución se utiliza para botellas u otros envases de vidrio para leche, así como para el equipo y utensilios empleados en la elaboración de alimentos. Los artículos tratados con esta solución se deben escurrir durante 15 minutos antes de ponerlos en contacto con los alimentos. No precisa aclarado final.*

13	Yodo y alquil (C12-C15) monoéter de etilen y propilenglicol + monoéter de polialquilenglicol, con un punto de niebla de 70-77°C en solución acuosa a 1% y con un peso molecular medio de 807	Como en 4	Como en 1
14	Yodo, butoxi-monoéter de etilen y propilenglicol+ butoximonoéter de polialquilenglicol, con un punto de niebla de 90-100°C, en solución acuosa al 0,5% y con un peso molecular medio de 3,300 y polioxietileno - polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque, con un peso molecular medio mínimo de 2,000.	Como en 4	Como en 1
15	Hipoclorito de litio	290 mg/kg de cloro y 30 ppm de litio.	Como en 1
16	Cantidades iguales de cloruro de n-alquil- (C12-C18) bencil- dimetil - amonio y cloruro de n-alquil (C12 a C14)-dimetil-(etil-bencil)-amonio (con pesos moleculares medios de 377-384). De forma opcional se puede adicionar etilen- diaminotetracetato tetrasódico y/o a-(p-nonil-fenol)-w-hidroxipolil (oxietileno) con un contenido de 11 moles.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activo.	Como en 1
17	Cloruro de di-n-alquil (C8-C10) dimetilamonio y alcohol isopropílico, con un peso molecular medio de 332-361.	150 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activo.	Como en 1
18	Cloruro de n-alquil (C12-C18) bencil-dimetil-amonio, metaborato sódico, -terpinol y a -[p-(1,1,3,3 tetrametil-butil)fenil]-w-hidroxipoli (oxietileno), producido con 1 mol de fenol y 4-14 moles de óxido de etileno.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activos y 66 mg/kg de a -[p-1,1,3,3 de tetra -metil-butil) fenil-w-hiroxipoli (oxietileno).	Como en 1
19	Di-cloro-iso-cianurato sódico y etilen-diamino-tetracetato tetrasódico.	100 mg/kg de cloro.	Como en 1
20	o-fenil-fenol, o-bencil-p-cloro fenol, p-amilfenol,	800 mg/kg de fenoles activos totales, que comprenden	Únicamente para aplicaciones de un solo uso.

	sulfato de a-alkil- (C12 a C15)-w-hidroxipoli-(oxietileno) y sodio con un contenido medio de polioxietileno terciario. no de 1 mol, sales potásicas de ácidos grasos de aceite de coco y alcohol isopropílico o hexilenglicol.	400 mg/kg de o-fenil-fenol 320 mg/kg de o-bencil-p-clorofenol y 80 mg/kg de p-amilfenol	
21	Dodecil-benceno-sulfonato sódico.	Entre 25 y 430 mg/kg del producto.	Como en 1