

DETERMINACIÓN DE LA LACTULOSA (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) COMO INDICADOR DE CALIDAD EN LECHE COMERCIALES, POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

MARISOL SALAZAR SANDOVAL

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2007**

DETERMINACIÓN DE LA LACTULOSA (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) COMO INDICADOR DE CALIDAD EN LECHE COMERCIALES, POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

MARISOL SALAZAR SANDOVAL

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Química

DIRECTORA

MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2007**

TABLA DE CONTENIDO

		pág.
	RESUMEN	
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	DEFINICIÓN Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICO-FÍSICAS DE LA LECHE	3
2.1.1	Leches enriquecidas con minerales y multivitaminas	4
2.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE	6
2.2.1	Agua	7
2.2.2	Lípidos	7
2.2.3	Carbohidratos	8
2.2.4	Proteínas	10
2.2.4.1	<i>Caseínas</i>	10
2.2.4.2	<i>Proteínas del suero</i>	12
2.2.5	Minerales	13
2.2.6	Vitaminas	14
2.2.7	Enzimas	15
2.2.8	Bacterias	16
2.3	CLASIFICACIÓN DE LAS LECHEs	17
2.3.1	Según las características fisicoquímicas, microbiológicas y otras	17
2.3.2	Según el proceso de higienización	22
2.4	CALIDAD DE LA LECHE	25
2.4.1	Análisis físicos, químicos y microbiológicos	27
2.5	TRATAMIENTO TÉRMICO Y ACCIÓN DEL CALOR SOBRE LOS ALIMENTOS	32

2.5.1	Efectos del tratamiento térmico sobre la calidad de la leche	32
2.6	INDICADORES DE TRATAMIENTO TÉRMICO	33
2.7	REACCIONES DE DEGRADACIÓN DE LA LACTOSA	35
2.8	LACTULOSA	38
2.9	ANÁLISIS DE LACTULOSA	41
3.	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GENERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4.	METODOLOGÍA	47
4.1	EQUIPOS, MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO Y REACTIVOS	47
4.1.1	Equipos	47
4.1.2	Material de vidrio y plástico	47
4.1.3	Reactivos	48
4.1.3.1	<i>Soluciones y mezclas</i>	49
4.2	CONDICIONES ASÉPTICAS DEL MATERIAL DE MUESTREO Y TRABAJO	51
4.2.1	Limpieza y secado del material	51
4.3	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	52
4.4	OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS Y ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LECHEs LÍQUIDAS	54
4.4.1	Prueba de reducción del azul de metileno (TRAM)	55
4.4.2	Prueba de fosfatasa	56
4.4.3	Determinación de la densidad	56
4.4.4	Determinación de acidez	57
4.4.5	Determinación de pH	57
4.4.6	Determinación del contenido de grasa	58
4.4.7	Determinación de extracto seco (ES)	58
4.4.8	Determinación del extracto seco desengrasado (ESD)	58
4.4.9	Determinación de proteína	59

4.4.10	Determinación de cenizas	60
4.4.11	Análisis estadístico	
4.5	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTULOSA	61
4.5.1	Calibración de los espectrofotómetros	62
4.5.2	Selección de la longitud de onda	62
4.5.3	Método de cuantificación	63
4.6	PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTULOSA	63
4.6.1	Linealidad	63
4.6.2	Precisión	64
4.6.2.1	<i>Repetibilidad ó precisión espectrofotométrica</i>	64
4.6.2.2	<i>Repetibilidad del método</i>	64
4.6.3	Sensibilidad	64
4.6.4	Exactitud del método	64
4.7	ESTABILIDAD DE LA LACTULOSA	65
4.8	EXTRACCIÓN DE LACTULOSA Y OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ABSORBENTE	65
4.8.1	Extracción de lactulosa	65
4.8.2.	Formación del Complejo coloreado	66
4.9	APLICACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTULOSA EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIALES	69
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
5.1	OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS Y ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LECHE LÍQUIDA	70
5.1.1	Optimización de pruebas microbiológicas	70
5.1.2	Estandarización e intercalibración de análisis físico-químicos	71

5.1.2.1	<i>Precisión</i>	71
5.1.2.2	<i>Intercalibración</i>	74
5.1.2.3	<i>Análisis estadístico</i>	76
5.1.2.4	<i>Exactitud</i>	77
5.2	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS LECHES UHT COMERCIALES	79
5.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS LECHES UHT COMERCIALES	81
5.4	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTULOSA	91
5.4.1	Calibración de los espectrofotómetros	92
5.4.2	Elección de longitud de onda	92
5.4.3	Método de cuantificación	96
5.5	PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LACTULOSA	97
5.5.1	Linealidad	98
5.5.2	Precisión	98
5.5.2.1	<i>Repetibilidad del método</i>	98
5.5.2.2	<i>Repetibilidad ó precisión espectrofotométrica</i>	100
5.5.3	Sensibilidad	101
5.5.4	Exactitud del método	103
5.6	ESTABILIDAD DE LA LACTULOSA	104
5.7	EXTRACCIÓN DE LACTULOSA Y OBTENCIÓN DEL COMPLE- JO ABSORBENTE	107
5.8	APLICACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTULOSA EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIALES	109
6.	CONCLUSIONES	117
	RECOMENDACIONES	120

BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	125

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Distribución de los minerales de la leche ¹³	13
Tabla 2. Composición en vitaminas en la leche ⁸	15
Tabla 3. Características fisicoquímicas y condiciones especiales de la leche cruda entera ³	19
Tabla 4. Características fisicoquímicas y condiciones especiales de la leche higienizada entera, semidescremada y descremada ³	20
Tabla 5. Características fisicoquímicas y condiciones especiales de la leche en polvo entera, semidescremada y descremada ³	21
Tabla 6. Indicadores del deterioro de la leche según la Reacción de Maillard (RM) ⁵	35
Tabla 7. Niveles máximos permitidos de Lactulosa ^{11, 28}	40
Tabla 8. Pruebas microbiológicas para evaluar la calidad de la leche	70
Tabla 9. Medidas de densidad de la leche en g/mL a 15 °C	72
Tabla 10. Medidas del porcentaje de acidez	72
Tabla 11. Medidas de pH de la leche	73
Tabla 12. Medidas del porcentaje de grasa	73
Tabla 13. Medidas del porcentaje de proteína	73
Tabla 14. Medidas del porcentaje de cenizas	74
Tabla 15. Resultados de la intercalibración de los análisis físico-químicos	75
Tabla 16. Porcentaje de error de los análisis físico-químicos	77
Tabla 17. Análisis microbiológico de leches comerciales procesadas térmicamente, enteras, semidescremadas y descremadas	80
Tabla 18. Caracterización físico-química de las leches enteras comerciales procesadas térmicamente	83
Tabla 19. Caracterización físico-química de las leches semidescremadas comerciales procesadas térmicamente	84

Tabla 20. Caracterización físico-química de las leches descremadas comerciales procesadas térmicamente	85
Tabla 21. Longitud de onda teórica según las reglas de Woodward–Fieser⁴³	96
Tabla 22. Repetibilidad del método de la lactulosa, usando los equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB – DMS 100	99
Tabla 23. Repetibilidad espectrofotométrica de la lactulosa, usando los equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB – DMS 100	101
Tabla 24. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC). Equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS–100	102
Tabla 25. Porcentaje de recuperación de la lactulosa por espectrofotometría UV-visible. Equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS - 100	104
Tabla 26. Datos de estabilidad de patrones de lactulosa de concentraciones 0,07, 0,1 y 0,3 mg/mL y de una muestra de leche (ApSCaV) en diferentes días. Equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS – 100	105
Tabla 27. Contenido de lactulosa (mg/mL) de leches líquidas ultra-pasteurizadas (UHT). Equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS–100	110
Tabla 28. Niveles de lactulosa encontrados en leches UHT y esterilizada en diferentes estudios	114
Tabla 29. Componentes mayoritarios de las muestras de leche según el envase	126
Tabla 30. Componentes minoritarios de las muestras de leche según el envase	127

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Estructura de la Lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa)	9
Figura 2. a) α-lactosa, b) β-lactosa	10
Figura 3. Estructura de una micela de caseína	11
Figura 4. Transformación Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein de lactosa a lactulosa⁶	37
Figura 5. Lactulosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructofuranosa)	38
Figura 6. Isómeros de la lactulosa	39
Figura 7. a) Producto de deshidratación del carbohidrato; b) Reacción de la antrona con el derivado furfural	44
Figura 8. Espectrofotómetro UV-visible, THERMO GENESYS 6	61
Figura 9. Espectrofotómetro UV-visible, INTRALAB-DMS 100	62
Figura 10. Extracción de lactulosa en metanol	66
Figura 11. Precipitación de la fracción proteínica	66
Figura 12. Espectros de absorción de lactulosa de concentraciones de 3 mg/mL y 15 mg/mL. a) Espectrofotómetro INTRALAB DMS-100 y b) Espectrofotómetro THERMO GENESYS 6	94
Figura 13. Curvas de calibración para la determinación de lactulosa: a) THERMO GENESYS 6, b) INTRALAB – DMS 100	97
Figura 14. Estabilidad en la concentración de lactulosa respecto al tiempo: a. THERMO GENESYS 6, b. INTRALAB DMS-100	106
Figura 15. Desplazamiento de longitud de onda de la especie absorbente	108

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Transformación de monosacáridos en medio alcalino	36
Diagrama 2. Metodología espectrofotométrica	68

RESUMEN

La importancia de la leche como un alimento de alto valor nutritivo (óptimo para incluir en la dieta del humano) genera inquietudes acerca de su composición y por tanto de su calidad con respecto a los tratamientos térmicos cuando es sometida a comercialización, aún más considerando la gran variedad de leches enriquecidas y adicionadas que existen en el mercado hoy en día.

Para profundizar un poco sobre la calidad de la leche procesada y consumida en Colombia, se estudiaron 21 muestras de leche ultrapasteurizadas (UHT), seleccionadas al azar entre la gran variedad de clases y marcas ofrecidas por el comercio. El análisis consistió en evaluar las características físicas, químicas y microbiológicas que establece la normativa Colombiana como parámetros de control de calidad, dentro de los que se encuentran las determinaciones de densidad, acidez, grasa, sólidos totales, sólidos no grasos y las pruebas de fosfatasa y tiempo de reducción del azul de metileno; adicionalmente, se evaluó el pH, el porcentaje de cenizas y de proteína.

Dicha caracterización resultó favorable puesto que los parámetros concordaban con los rangos establecidos y aceptados por las normas para calificar una leche como apta para el consumo.

Por otra parte, como una medida de control de los procesos térmicos, se evaluó el contenido de lactulosa, un indicador de calidad de la leche, el cual permite identificar el tratamiento térmico empleado; este análisis se realizó por un método colorimétrico, empleando dos espectrofotómetros, con el fin de comparar sus sensibilidades.

Los contenidos de lactulosa en las leches analizadas se encuentran en el rango de 0,7 a 6,8 mg/mL en el espectrofotómetro THERMO GENESYS 6 y de 0,5 a 7,2 mg/mL en el espectrofotómetro INTRALAB DMS-100, valores que resultaron muy superiores a los encontrados y establecidos para leches ultrapasteurizadas en la normatividad Europea, la cual fue el punto de comparación, debido a que en Colombia no existe una norma que evalúe el contenido de lactulosa según el tratamiento térmico empleado.

El método presentó una buena correlación lineal, $r = 0,9996$ para el espectrofotómetro THERMO GENESYS 6 (con límites de detección y cuantificación de 0,015 y 0,049 mg/mL, respectivamente y un porcentaje de recuperación de 94,2%), y $r = 0,9957$ para el espectrofotómetro INTRALAB DMS-100 (cuyos límites de detección y cuantificación fueron 0,012 y 0,040 mg/mL, respectivamente y un porcentaje de recuperación de 96,0%).

1. INTRODUCCIÓN

La leche, desde el punto de vista nutricional, siempre ha sido considerado un alimento casi completo para el hombre¹. Por su equilibrada composición, es un alimento noble que provee a nuestro organismo proteínas, grasa y algunas vitaminas y minerales necesarios².

La salubridad y aceptabilidad de este alimento dependen de un control sanitario muy estricto¹, cuyo objeto es reducir al mínimo los posibles peligros para la salud debidos a la presencia de microorganismos; para ello, la leche cruda es sometida a procesos físicos de higienización, tales como: pasteurización, irradiación, ultrapasteurización y esterilización; estos procedimientos están basados en una relación de temperatura-tiempo que no permite alterar, en la leche, ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas u organolépticas³, pero que no siempre son suficientes para garantizar un tiempo prolongado de vida útil del producto; por ejemplo, la pasteurización e irradiación producen leches que sólo pueden conservarse a temperaturas de refrigeración por pocos días, la ultrapasteurización permite obtener productos más duraderos que permanecen inalterables por más tiempo, mientras que la esterilización da como resultado productos conservables hasta por 12 meses a una temperatura ordinaria⁴.

Por otra parte, los tratamientos térmicos pueden producir en la leche de partida modificaciones indeseables⁵, presentándose cambios en algunos de los componentes de la leche, como es el caso de los carbohidratos y minerales, que pueden alterar el aroma, el color, la consistencia y reducir el valor nutritivo debido a la formación de compuestos que no estaban presentes en la leche no procesada, tales como son la lactulosa, el hidroximetilfurfural, la furosina, etc⁵.

Para producir leches de elevada calidad, es necesario conocer los cambios que ocurren en los componentes de la misma durante el tratamiento térmico al que son sometidas⁶, puesto que su calidad puede estar relacionada con la cantidad de calor aplicado durante los procesos; por tanto, es necesario contar con indicadores que permitan identificar el tipo de tratamiento térmico empleado y como una medida de control del proceso⁷.

Considerando que en nuestro país y más aún en el departamento del Cauca, el control de calidad de la leche comprende un análisis fisicoquímico rutinario, resulta interesante poder implementar y aplicar un método sencillo por una técnica de fácil acceso como espectrofotometría UV-visible, que contribuya a un análisis de rutina más específico y confiable y que aporte y complemente a la evaluación de la calidad de la leche después de haber sido sometida a un tratamiento térmico en las Industrias procesadoras de leche.

Uno de los indicadores de tratamiento térmico más extensamente estudiado es la lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa), conocida por su formación durante el tratamiento térmico. Este indicador se forma por una reacción de isomerización de la lactosa mediante la transformación Lobry de Bruyn-Alberda Van Ekenstein y representa indudablemente el índice más apropiado para establecer la carga de calor a la cual la leche fue sometida⁶.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICO-FÍSICAS DE LA LECHE

La leche es el producto de la secreción normal de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, obtenida por uno o varios ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos³; es un líquido opaco, de color blanco a blanco amarillento, de sabor ligeramente dulce y olor característicamente inespecífico⁸ (cuando el color es amarillento ó verde-amarillento, este se debe a los carotenos de la fase oleosa y a la riboflavina de la fase acuosa⁸); físicamente, constituye un sistema complejo: es una suspensión coloidal de partículas en una fase acuosa dispersante. Las partículas son glóbulos de materia grasa, pero existen además micelas proteicas formadas por la interacción de caseínas y otras proteínas con las sales minerales presentes en la fase acuosa. Estas son las partículas en suspensión, responsables de la consistencia, opalescencia y el aspecto blancuzco de la leche⁹.

Algunas propiedades físicas y químico-físicas como pH (6,5-6,75), índice de refracción (n_D^{20} 1,3410-1,3480), conductividad eléctrica específica ($4,0-5,5 \times 10^{-3}$ Ohm⁻¹cm⁻¹), permiten realizar una evaluación preliminar de la leche y en ciertos casos, dar una idea de su composición; ejemplos de ello son: La masa específica de la leche (1,029-1,034 a 15°C), que aumenta o disminuye de acuerdo con el contenido de grasa; el punto de congelación (-0,53 hasta -0,55°C), que permite determinar el aguado de la leche y el potencial redox, que revela la actividad reductora de los microorganismos (+0,30 para leche cruda y +0,10 para leche pasteurizada)⁸.

2.1.1 Leches enriquecidas con minerales y multivitaminas: en el desarrollo de un alimento se busca no solo satisfacer el apetito, sino promover un estado de bienestar, mejorar la salud y reducir el riesgo de enfermedades a través de la promoción del consumo de algunos alimentos específicos ó la adición ó enriquecimiento con productos, tales como fibra alimentaria, oligosacáridos, alcoholes, aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados, ácido fólico, antioxidantes naturales, elementos minerales y bacterias, con lo que se originan los llamados alimentos funcionales¹.

No existe un acuerdo sobre la definición de alimentos funcionales, pero en general, son aquellos que pueden proporcionar un beneficio para la salud, además de nutrición básica. Algunos ejemplos de estos alimentos incluyen tanto a las frutas y a las verduras como a otros alimentos fortificados y mejorados¹.

La adición de nutrimentos a los alimentos, es uno de los aspectos más difíciles y complejos de la tecnología, ya que antes de efectuarlos, se deben determinar perfectamente las necesidades del consumidor y el tipo de alimento en el que se va a llevar a cabo esta adición; la adición de nutrimentos se hace por alguna de las siguientes razones: *a)* reconstitución, *b)* estandarización, para compensar la variación natural del contenido de nutrimentos, *c)* enriquecimiento y *d)* fortificación, donde se agregan los nutrimentos que normalmente no están presentes en el alimento⁴.

Durante la fortificación de los alimentos, se requiere conocer muy bien los efectos físicos y químicos que el nutrimento puede tener sobre ellos; así por ejemplo, la adición de cobre o hierro a alimentos con elevados contenidos en ácidos grasos insaturados, acelera las reacciones de oxidación de los lípidos; la adición de tiamina a un producto fluido que contenga vitamina C y riboflavina, produce reacciones fotoquímicas y genera varios compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables; la adición de vitamina A a la leche descremada y

condensada, es poco recomendable, ya que durante la esterilización se producen muchos sabores indeseables que provienen de las reacciones de descomposición de dicha vitamina en ausencia de lípidos que la protejan. Por otra parte, la adición de nutrimentos puede resultar muy complicada debido a los problemas que se presentan para obtener su distribución homogénea en el alimento, siendo necesario añadir aditivos que ayuden a estabilizarlo. Por tanto, deben tomarse muchas precauciones antes de efectuar la fortificación⁴.

La mayoría de los expertos en nutrición se oponen a enriquecer a los alimentos de una manera indiscriminada, ya que una dieta normal proporciona todos los nutrientes necesarios y un exceso de ellos, puede ser peligroso para la salud; no obstante, existen leches enriquecidas para satisfacer la demanda nutricional que existe en algunos países¹.

A la leche se le añade generalmente, una larga serie y cantidad suficiente de vitaminas y minerales para que se aporten por cada litro las dosis mínimas (niveles en 100 g deben ser superiores al 15 por ciento de la ingesta diaria) recomendadas de vitamina A, D, tiamina, riboflavina, niacina y hierro, esenciales para el crecimiento, funcionamiento y regeneración de los tejidos corporales. La vitamina C no se suele añadir, ya que se destruye rápidamente durante el tratamiento térmico y en el almacenamiento de la leche; sin embargo, junto al hierro y al ácido fólico, participa en la formación de los glóbulos rojos; esto a su vez hace que el consumo de hierro prevenga y cure la anemia¹. Otros minerales como el zinc, son esenciales en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos.

El enriquecimiento con calcio, apoya la buena formación de huesos y dientes, y previene la osteoporosis, mejorando la cantidad y calidad de la masa ósea; este enriquecimiento se basa en la adición de leche en polvo o fracciones de leche, pero también puede conseguirse a través de adiciones de sales de calcio y/o de

calcio-fósforo; también se han comenzado a comercializar productos que sustituyen la grasa de leche por una mezcla de grasas (vegetales y pescado) con objeto de incorporar ácidos grasos polinsaturados y omega-3, de potencial interés para la salud, ya que ayudan a controlar el nivel de colesterol y triglicéridos, disminuyendo el riesgo de enfermedades cardíacas¹.

De igual manera, existen leches con un contenido bajo en lactosa, debido a que existe un número elevado de personas que sufren de intolerancia a la lactosa, es decir, que no absorben fácilmente el disacárido en el intestino, generando un desorden intestinal debido a la fermentación microbiana del mismo; por tanto, la leche es tratada con la enzima lactasa durante el envasado, con el fin de hidrolizar la lactosa a glucosa y galactosa, azúcares que si son rápidamente absorbidos por el intestino¹.

El enriquecimiento con fibra dietaria, favorece la absorción de agua y sodio, incrementando el número de movimientos intestinales; este alimento no ayuda a adelgazar ó a reducir el peso corporal, excepto cuando hace parte de una dieta en la cual, la ingestión total de calorías es controlada¹.

2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE

Químicamente, la leche se define como una mezcla compleja de sustancias alimenticias orgánicas e inorgánicas, entre las cuales se deben destacar: agua, grasas, carbohidratos (principalmente la lactosa), proteínas, minerales, vitaminas, enzimas y bacterias¹⁰. Es un sistema relativamente estable, debido a que todos sus constituyentes se encuentran en equilibrio formando tres estados físicos de dispersión, los cuales varían de acuerdo con factores como la acidez y la temperatura; estos estados de dispersión son: *a*) Solución, estado del que hacen parte la lactosa, así como sales, cationes, aniones y vitaminas hidrosolubles, *b*)

suspensiones coloidales, formadas por las proteínas, tanto caseínas como las del suero, y c) un estado de emulsión, conformado por los glóbulos de grasa⁴.

La composición de la leche varía notablemente de un animal a otro; factores como la raza, alimentación y etapa de lactancia, producen leche con variaciones considerables, en especial, en lo que respecta al contenido de grasa⁸.

De igual manera, la leche de cada vaca muestra variaciones de uno a otro día; este tipo de variaciones dependen también del estado físico y mental del animal, ya que ejercen un efecto adverso tanto en la calidad como en la cantidad de leche que se produce¹¹.

A continuación, se detallan las características más importantes de los componentes de la leche.

2.2.1 Agua: es el principal componente de la leche (63-87 %) independiente de la variación en la composición⁸.

2.2.2 Lípidos: la grasa láctea se halla finamente repartida en el plasma y se asocia para formar glóbulos grasos esféricos, que están rodeados por una membrana formada por fosfolípidos y una doble capa de proteína que constituye el 2 % de la masa total del glóbulo; además de lipoproteínas, la membrana contiene enzimas tales como xantinoxidasa, acetilcolinesterasa y fosfatasa alcalina⁸. Esta membrana estabiliza los lípidos hidrófobos en el plasma acuoso de la leche¹³.

La relación entre los glóbulos grasos y la fase acuosa de la leche se modifica de diferentes formas durante el almacenamiento ó procesado de la leche, de ahí la diferencia en el contenido de grasa en las diversas leches comerciales enteras (leches sometidas a un tratamiento térmico, con un contenido mínimo de 3,0 % de grasa)³, semidescremadas (leches tratadas térmicamente, con un contenido de

grasa entre 1,5 % y 1,8 %) y descremadas (leches tratadas térmicamente, cuyo contenido de grasa es inferior al 0,3 %)^{8, 13}.

La composición media de lípidos en la leche de vaca es de 35 g/L^{9, 18}. Los triacilglicerolos (triglicéridos), constituyen hasta el 98 % de los lípidos totales y están presentes en glóbulos rodeados por una membrana derivada de la membrana plasmática apical celular¹²; se pueden encontrar como di, mono glicéridos y ácidos grasos libres, junto a cantidades mensurables de fosfolípidos (0,8-1,0 %), colesterol, (0,2-0,4 %), ésteres de colesterol y cerebrósidos⁸. Otros componentes se encuentran sólo en cantidades muy pequeñas, pero pueden ser importantes para las propiedades organolépticas o desde el punto de vista nutritivo; entre ellos podemos citar a las vitaminas liposolubles, principalmente A (40-48 µg/100 mL)^{8, 9}, D (0,1 µg/100 mL)^{8, 9} y E (60-150 µg/100 mL)⁹ junto a pequeñas cantidades de vitamina K (4,7 µg/100 mL)⁹; existen además, compuestos responsables del aroma y del sabor como aldehídos, cetonas y lactonas y algunos pigmentos carotenoides¹³.

En cuanto a su composición en ácidos grasos, todas las grasas lácteas bovinas presentan el mismo espectro de ocho ácidos grasos saturados con número par de átomos de carbono (4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0 y 18:0), dos ácidos grasos saturados con número impar de átomos de carbono (15:0 y 17:0), dienos (18:2), trienos (18:3) y tres ácidos grasos monoinsaturados (14:1, 16:1 y 18:1). La proporción de cada ácido graso varía de acuerdo con el estado de lactación; en condiciones normales, los ácidos grasos saturados suponen el 70 %, los monoinsaturados el 27 % y dienos y trienos sólo el 3 % del contenido total de ácidos grasos en peso¹³.

2.2.3 Carbohidratos. La lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa) ó “azúcar de la leche”, es el carbohidrato predominante en la leche bovina (4-6 %)^{8, 12}, que contribuye al sabor característico de la leche; sin embargo, también

contiene trazas de otros azúcares tales como glucosa y galactosa libre y en menor cantidad arabinosa, manosa, aminoazúcares y oligosacáridos¹⁴; su capacidad edulcorante es aproximadamente la cuarta parte de la que posee la sacarosa e inferior al de la fructosa (la quinta parte) y glucosa (la mitad)⁸. Este carbohidrato es un disacárido constituido por dos moléculas de α -D-glucosa y β -D-galactosa¹³, que existe de forma natural en la leche, principalmente libre, aunque también en pequeña proporción como componente de otros oligosacáridos mayores. Su estructura se muestra en la figura 1.

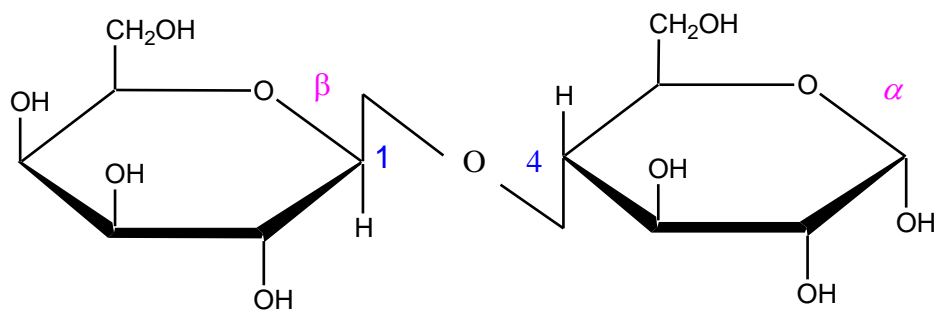


Figura 1. Estructura de la Lactosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa)

Existen tres anómeros de la lactosa: α -lactosa monohidratada y α y β -lactosa anhidras; la forma β tiene una solubilidad mucho mayor, pero por mutarrotación alcanza en solución un equilibrio de las dos formas¹³. La velocidad de la mutarrotación depende tanto de la temperatura como del pH; así, el fuerte aumento de la velocidad a $\text{pH} < 2$ y $\text{pH} > 7$ se debe a que la velocidad de apertura de la forma anular, está catalizada tanto por iones H^+ como OH^- ⁸. La forma más estable es la α -lactosa monoin saturada⁸ y la proporción de estos anómeros depende de la temperatura; al aumentar la temperatura disminuye la forma β . Las estructuras de estos anómeros, se representan en la figura 2.

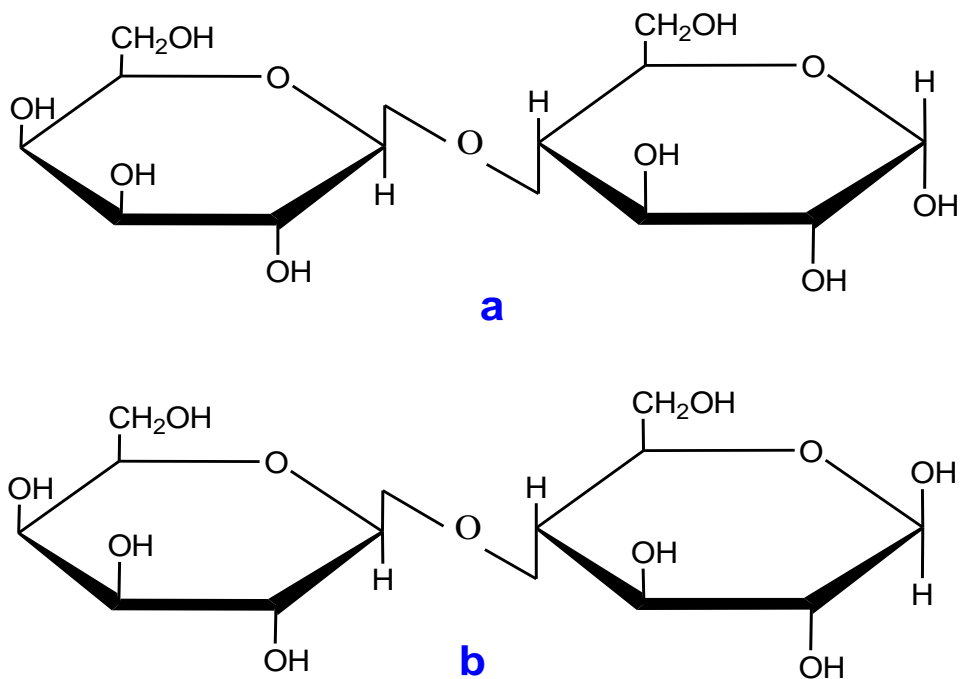


Figura 2. a) α -lactosa, b) β -lactosa.

2.2.4 Proteínas: las proteínas de la leche comprenden 35 g/L de la composición media⁹ y están constituidas principalmente por caseínas y proteínas del suero o “lactosuero”; la caseína constituye la mayor fracción de las proteínas de la leche bovina¹², y comprende más del 80 % de las proteínas totales de la leche, aunque la proporción relativa de las proteínas del lactosuero frente a las caseínas, varía según el estado de lactación¹³. La leche producida en los primeros días después del parto y hacia el final de la lactación, tiene un contenido de proteínas del suero mucho mayor que el que tiene la leche a la mitad de la lactación; este incremento está acompañado de niveles elevados de proteínas del suero sanguíneo¹³.

2.2.4.1 Caseínas: las caseínas de la leche se pueden subdividir en cinco tipos: α_{s1} , α_{s2} , β , γ y κ caseínas; las α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseínas, constituyendo el 92 % del contenido proteico de las micelas, se sintetizan en la glándula mamaria, a

excepción de la γ -caseína, que se origina en la proteólisis post-translacional de la β -caseína, por la acción de las proteínas nativas de la leche, principalmente, plasmita o por la actividad proteolítica de las bacterias. Las proporciones relativas de α , β y κ caseínas están sujetas a variaciones genéticas dentro de los rebaños y por lo tanto, pueden existir diferencias significativas en la composición de la caseína en diferentes vacas¹³.

Todas las caseínas forman un complejo esférico altamente hidratado que contiene fosfato cálcico y que se denomina micela (fosfo-caseinato)^{12, 14}. La formación de estos complejos esféricos se debe al carácter anfílico de las caseínas y a su fosforilación, que facilitan las interacciones entre ellas y con los grupos fosfoserina en la estructura del fosfato cálcico. La estructura de una micela, se representa en la figura 3:

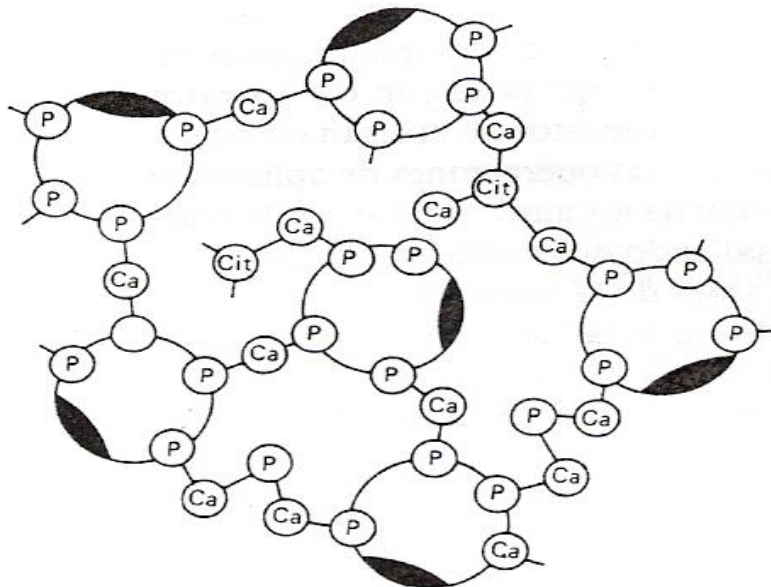


Figura 3. Estructura de una micela de caseína

El fosfato de calcio es un complejo inorgánico que contiene pequeñas cantidades de potasio, sodio y citrato de calcio; se encuentra distribuido por la micela y es de

importancia para su estabilidad frente al calor, constituyendo el 8 % restante del contenido proteico de las micelas junto a iones calcio absolutamente esenciales para la formación de dicha micela^{13, 8}; al acidificar la leche, el fosfato inorgánico se disuelve, mientras que los fosfatos orgánicos precipitan en forma conjunta con la caseína¹⁴.

De los tipos de caseínas existentes, el grupo α , que constituye el 40 %, es sensible a los iones calcio que la flocculan; la β -caseína, con una proporción alrededor del 30 %, no es sensible a estos iones a temperaturas inferiores a 10 °C pero sí a altas temperaturas como la de pasteurización (72-75 °C); la porción κ que constituye un 20 %, tampoco presenta sensibilidad a ellos y puede actuar como agente protector de las fracciones α y β , manteniéndose en suspensión, por lo cual juega un papel importante en la estabilidad del producto¹⁴.

2.2.4.2 Proteínas del suero: las proteínas del lactosuero comprende: dos tipos de proteínas nativas (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina), la fracción proteosa-peptona (derivada de la hidrólisis de la β -caseína) y pequeñas cantidades de proteínas de origen sanguíneo, tales como, albúmina del suero (seroalbúmina) e inmunoglobulinas, siendo la proteína mayoritaria del lactosuero la β -lactoglobulina¹³.

Estas proteínas tienen una estructura globular compacta, en la que los grupos polares, no polares y los iones, tienen una distribución relativamente uniforme y pueden sufrir un plegamiento intramolecular como resultado de la formación de puentes disulfuro entre los grupos sulfhidrilo de las cisteínas, quedando la mayor parte de los grupos hidrófobos, encerrados en el interior de la molécula. Por esta razón, las proteínas del lactosuero no se agregan fuertemente ni interactúan con otras proteínas en estado nativo¹³.

2.2.5 Minerales: los minerales representan del 0,6 % al 0,8 % del peso de la leche⁴, y están constituidos principalmente por cloruros, fosfatos, citratos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio^{12, 13}.

Todos los minerales se distribuyen entre una fase soluble y una fase coloidal, esta distribución y sus interacciones con las proteínas de la leche, tiene importantes consecuencias en la estabilidad de la leche y sus derivados, ya que la función primaria de las sales es la de neutralizar las cargas negativas repulsivas de los grupos ortofosfato de las α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas, permitiendo así que esta porción de la submicela interaccione por asociación hidrofóbica. Las numerosas interacciones hidrofóbicas individualmente débiles pero colectivamente fuertes, constituyen una fuerza de gran importancia en la estabilización de las micelas^{12, 13}.

La distribución de los minerales en las fases soluble y coloidal, se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los minerales de la leche¹³.

<i>Elemento ó minerales</i>	<i>Contenido (%)</i>	
	<i>Fase soluble</i>	<i>Fase coloidal</i>
Calcio total	33	66
Calcio ionizado	100	0
Cloruros	100	0
Citratos	94	6
Magnesio	67	33
Fósforo total	45	55
Fósforo inorgánico	54	46
Potasio	93	7
Sodio	94	6

En lo que respecta al comportamiento de los minerales frente a los tratamientos térmicos, las sales de la leche pueden ser de dos tipos: las que no sufren ninguna modificación como las de sodio, y las que resultan afectadas como el calcio, citrato y fosfato; el tratamiento modifica los equilibrios de las sales de calcio, produciendo una disminución en el calcio soluble y la precipitación del fosfato cálcico¹³; así, cuando la elevación de temperatura es moderada y no sobrepasa los 55-60 °C, se observa que la insolubilización progresiva del fosfato cálcico va acompañada de la integración del mismo en las micelas de fosfocaseinato en forma de una sal coloidal similar a la estructura nativa, produciéndose una mineralización de las micelas y como consecuencia, un aumento del tamaño medio de las mismas y probablemente una disminución del grado de hidratación. Estas modificaciones parecen ser completamente reversibles mediante el enfriamiento de la leche calentada¹. Cuando la acción térmica es acentuada, sobre todo cuando la temperatura sobrepasa los 75-80 °C, la insolubilización del fosfato cálcico a nivel de las micelas, se produce bajo una forma diferente del fosfato tricálcico coloidal nativo¹.

Además, existen otros elementos traza en la leche, siendo el más abundante el Zn, asociado en un 85 % con las micelas de las caseínas¹⁴. El hierro (Fe) también está presente en la leche y la fortificación con sales férricas protege a la lipasa de la leche de su desnaturalización térmica, por lo que se requiere de aproximadamente 10 °C más en la temperatura de pasteurización para inactivar esta enzima en presencia de hierro oxidado⁴.

2.2.6 Vitaminas: la leche contiene un complemento de vitaminas, por ello es importante en la dieta como fuente de las mismas. Sin embargo, este contenido en vitaminas se puede modificar por pérdidas durante el procesado y el almacenamiento¹³.

Las vitaminas que se encuentran en la leche, se pueden clasificar en: Liposolubles, donde se encuentran en moderadas cantidades la vitamina A en forma de precursor β -caroteno, D y E, e hidrosolubles como las del grupo B, especialmente B₁, B₂, B₆ y B₁₂, C, ácido pantoténico, niacina, biotina y ácido fólico¹³. Su proporción en mg/L de leche se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición en vitaminas en la leche⁸.

<i>Vitamina</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
A (retinol)	0,4
D (colciferol)	0,001
E (tocoferol)	1,0
B ₁ (tiamina)	0,4
B ₂ (riboflavina)	1,7
B ₆ (piridoxina)	0,6
B ₁₂ (cianocobalamina)	0,005
Nicotinamida	1,0
Ácido pantoténico	3,5
C (ácido ascórbico)	20,0
Biotina	0,03
Ácido fólico	0,05

2.2.7 Enzimas: la leche contiene una gran cantidad de enzimas, las cuales tienen importancia analítica ya que permiten determinar si hubo ó no, un calentamiento excesivo durante el tratamiento térmico; la diferente sensibilidad térmica (inactivación) de las diversas enzimas lácteas, permite predecir el tipo y la magnitud del tratamiento térmico aplicado⁸.

Aunque están en pequeñas cantidades, las enzimas puedan influir de forma importante en la estabilidad de los productos lácteos y pueden estar presentes en la leche como resultado del crecimiento microbiano; son particularmente

importantes las proteasas y lipasas, debido a sus efectos sobre el aroma, sabor y estabilidad de las proteínas, mientras que las oxidoreductasas afectan el aroma y el sabor, especialmente en la fracción lipídica^{12, 13}.

La plasmita es la principal proteinasa de la leche y su concentración varía de acuerdo con el grado de transferencia de componentes sanguíneos a la leche, siendo alta al comienzo y final de la lactación; es muy termoestable al pH normal de la leche (6,5-6,7) y mantiene una actividad considerable después de la pasteurización¹³.

La lipasa es la principal lipoproteína de la leche; se encuentra en cantidades elevadas en la leche recién ordeñada, pero el efecto protector de la membrana del glóbulo graso impide la acción de esta enzima, es decir, hace que la lipólisis intensa debida a la lipasa sea un hecho poco frecuente en esta leche¹³.

La leche contiene varias oxidoreductasas, incluyendo catalasa, lactoperoxidasa y xantinoxidasa. La lactoperoxidasa se encuentra en elevadas concentraciones y es capaz de catalizar la oxidación de los ácidos grasos insaturados, con la subsecuente aparición de sabores oxidados; esta enzima también forma parte del complejo lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno (LPS), que es un sistema antimicrobiano potencialmente importante¹³.

Otra de las enzimas mejor conocida es la fosfatasa alcalina, que no afecta a la estabilidad de la leche, lo cual se debe a que se inactiva casi por completo a la temperatura de pasteurización y es ampliamente utilizada como índice de un tratamiento térmico adecuado¹³.

2.2.8 Bacterias: casi todas las formas bacterianas de importancia en lechería, tienen origen vegetal⁴. La leche extraída asépticamente de ubres sanas no es estéril, pero contiene un pequeño número de bacterias, que se conocen como

microorganismos de la ubre (flora banal)^{4, 13}; entre ellos predominan los *micrococos* y *estreptococos*, aunque también son frecuentes las bacterias *corineformes* incluyendo *Corynebacterium bovis*; estas bacterias, no tienen un efecto importante en la calidad, ni sobre el rendimiento lechero¹³.

La leche también es una fuente de microorganismos patógenos¹³. Las bacterias saprofitas que se encuentran pertenecen al grupo de las bacterias *lácticas*; se trata de gérmenes de la familia de las *Lactobacteriaceae*⁴; esta familia comprende dos tribus: Las *Streptococceae* (formas esféricas) y las *Lactobacilleae* (formas en bastoncillo); la tribu *Streptococceae* comprende dos géneros: *Streptococcus* y *Leuconostoc*, mientras que la tribu *Lactobacilleae* sólo incluye el género *Lactobacillus*⁴.

Algunas de estas especies producen a expensas de la glucosa, 85 % a 95 % de ácido láctico, denominándose homofermentativas; otras producen 50 % de ácido láctico, 20 % a 25% de anhídrido carbónico y 20 % a 25 % de alcohol y ácido acético y se conocen como heterofermentativas⁴.

2.3 CLASIFICACIÓN DE LAS LECHES

De acuerdo con las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos del Ministerio de Salud³, las leches pueden clasificarse en dos categorías: por sus características fisicoquímicas y microbiológicas y, según el proceso de higienización al que hayan sido sometidas. A continuación, se describen cada una de ellas.

2.3.1 Características fisicoquímicas, microbiológicas y otras: de acuerdo con sus características fisicoquímicas, microbiológicas y otras especiales señaladas en el Decreto N° 2437 de 1983 del Ministerio de Salud³, las leches se clasifican en los siguientes tipos:

1. Leche cruda entera (Tabla 3),
2. Leche higienizada entera, semidescremada y descremada (Tabla 4), y
3. Leche en polvo entera, semidescremada y descremada (Tabla 5),

cada una de ellas con las siguientes características (Tablas 3, 4 y 5):

Tabla 3. Características fisicoquímicas y condiciones especiales de la leche cruda entera³.

Características fisicoquímicas	Valor	Condiciones especiales
ρ 15/15 °C (g/mL)	1,0300 – 1,0330	Ensayo de reductasa, mínimo 4 horas.
% G (% p/p)	Mínimo 3,0	
ES (% p/p)	Mínimo 11,3	
ESD (% p/p)	Mínimo 8,3	Prueba de alcohol, no se coagulará.
(IM) (mg/500 cm ³) norma o disco	En grado máximo de 1,0 para leche proveniente de hatos de primera categoría y 4,0 para leche proveniente de hatos de segunda categoría.	
Acidez (% ácido láctico)	0,14 a 0,19	Ausencia de sustancias tales como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas, se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud.
Índice crioscópico (°C)	- 0,54 (\pm 0,01 °C)	
Índice de refracción n_D^{20}	Mínimo 1,3420	
Índice lactométrico (°L)	Mínimo 8,4	
		Ausencia de calostro, sangre u otros elementos extraños en suspensión.

Tabla 4. Características fisicoquímicas y condiciones especiales de la leche higienizada entera, semidescremada y descremada³.

Tipo de leche	Características fisicoquímicas	Valor	Condiciones especiales
Entera	ρ 15/15 °C (g/mL)	1,0300 – 1,0330	Prueba de fosfatasa para leche pasteurizada, ultrapasteurizada y esterilizada: negativa; para leche irradiada: positiva. Prueba de peroxidasa: leche pasteurizada e irradiada: positiva; leche ultrapasteurizada y esterilizada: negativa. Ensayo de reductasa, mínimo 7 horas. Prueba de alcohol: no se coagulará. Ausencia de sustancias como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas, se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud.
	% G (% p/p)	Mínimo 3,0	
	ES (% p/p)	Mínimo 11,3	
	ESD (% p/p)	Mínimo 8,3	
	IM (mg/500 cm ³) norma o disco	En grado máximo de 0,5	
	Acidez (% ácido láctico)	0,14 a 0,19	
	IC (°C)	- 0,54 (± 0,01 °C)	
	n_D^{20}	Mínimo 1,3420	
Semidescremada	ρ 15/15 °C (g/mL)	1,0310 – 1,0335	Prueba de fosfatasa para leche pasteurizada: negativa; leche ultrapasteurizada y esterilizada: negativa en planta; leche irradiada: positiva. Prueba de peroxidasa: leche ultrapasteurizada y esterilizada: negativa. Ensayo de reductasa, mínimo 7 horas. Prueba de alcohol: no se coagulará Ausencia de sustancias como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas, se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud.
	% G (% p/p)	Mínimo 1,5 a 2,0	
	ES (% p/p)	Mínimo 9,8	
	ESD (% p/p)	Mínimo 8,3	
	IM (mg/500 cm ³) norma o disco	En grado máximo de 0,5	
	Acidez (% ácido láctico)	0,14 a 0,19	
	IC (°C)	-0,54 (± 0,01 °C)	
	n_D^{20}	Mínimo 1,3420	
Descremada	ρ 15/15 °C (g/mL)	1,0340 – 1,0360	Prueba de fosfatasa para leche pasteurizada, ultrapasteurizada y esterilizada: negativa; para leche irradiada: positiva Prueba de peroxidasa: leche pasteurizada e Irradiada: positiva; leche ultrapasteurizada y esterilizada: negativa. Ensayo de reductasa mínimo, 7 horas. Prueba de alcohol: no se coagulará. Ausencia de sustancias como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud.
	% G (% p/p)	Mínimo 0,1 a 0,5	
	ES (% p/p)	Mínimo 8,7	
	ESD (% p/p)	Mínimo 8,6	
	IM (mg/500 cm ³) norma o disco	En grado máximo de 0,5	
	Acidez (% ácido láctico)	0,14 a 0,19	
	IC (°C)	- 0,54 (± 0,01 °C)	
	n_D^{20}	Mínimo 1,3420	

Tabla 5. Características fisicoquímicas y condiciones especiales de la leche en polvo entera, semidescremada y descremada³.

Tipo de leche	Características fisicoquímicas	Valor	Condiciones especiales
Entera	Humedad (% p/p)	Máximo 4,5	Puede estar adicionada de: <ul style="list-style-type: none"> • Mono y diglicéridos: máximo 0,25 % m/m • Lecitina: máximo 0,5 % m/m Ausencia de sustancias como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud.
	% G (% p/p)	Mínimo 2,6	
	IM (mg/500 cm ³) norma o disco	Máximo 15	
	Acidez (% m/m ácido láctico)	1,0 a 1,3	
	Índice de solubilidad (cm ³)	Máximo 1,25	
	Na (% p/p)*	Máximo 0,42	
	K (% p/p)*	Máximo 1,30	
Cenizas (% p/p)	Máximo 6,0		
Semidescremada	Humedad (% p/p)	Máximo 5	Puede estar adicionada de: <ul style="list-style-type: none"> • Mono y diglicéridos: máximo 0,25 % m/m • Lecitina: máximo 0,5 % m/m Ausencia de sustancias como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud.
	% G (% p/p)	12 a 15	
	IM (mg/500 cm ³) norma o disco	Máximo 15,0	
	Acidez (% m/m ácido láctico)	1,2 a 1,5	
	Índice de solubilidad (cm ³)	Máximo 1,25	
	Na (% p/p)*	Máximo 0,5	
	K (% p/p)*	Máximo 1,50	
Cenizas (% p/p)	Máximo 7,2		
Descremada	Humedad (% p/p)	Máximo 5	No debe estar adicionada de monoglicéridos, diglicéridos o lecitina. Ausencia de sustancias como adulterantes, preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales FAO, OMS, u otras adoptadas por el Ministerio de Salud..
	% G (% p/p)	Máximo 1,5	
	IM (mg/500 cm ³) norma o disco	Máximo 22,5	
	Acidez (% m/m ácido láctico)	1,4 a 1,7	
	Índice de solubilidad (cm ³)	Máximo 2,0	
	Na (% p/p)*	Máximo 0,55	
	K (% p/p)*	Máximo 1,80	
Cenizas (% p/p)	Máximo 8,2		

*Na y K (como constituyente natural)

Los procedimientos que tienen entre sus fines la destrucción de los microorganismos por el calor, hacen referencia tanto a la pasteurización, irradiación, ultrapasteurización y esterilización, cuya finalidad es precisamente la destrucción microbiana dando como resultado leches higienizadas, ya sea enteras, semidescremadas o descremadas. A continuación, se definen este tipo de leches de acuerdo con su clasificación.

2.3.2 Proceso de higienización: según el proceso al que haya sido sometida la leche, se distinguen los siguientes tipos de leche higienizada entera, semidescremada o descremada¹⁵:

1. Pasteurizada: es el producto obtenido al someter la leche cruda entera a una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir su flora patógena y la casi totalidad de su flora banal, sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas u organolépticas³. El proceso se denomina pasteurización comercial (pasteurización alta H.T.S.T.) y desnaturaliza las inmunoglobulinas y un porcentaje bajo del resto de proteínas del suero^{4, 10} y consiste en elevar la temperatura del producto de 72 hasta 75 °C durante 15 a 30 segundos⁸. El producto, es una leche que sólo puede conservarse a temperaturas de refrigeración por pocos días⁴ (48 horas después de envasada)³.

Adicionalmente, existen otros procesos de pasteurización: pasteurización baja o mínima, donde la leche se somete a una temperatura de 65 °C por 30 minutos, donde se ocasiona la inactivación de la fosfatasa alcalina y la lipasa y se conserva mejor el valor nutritivo, aunque su efecto germicida es bajo^{4, 10}; pasteurización alta o calentamiento alto, donde la leche se somete a 85 °C por 2-3 segundos⁸.

2. Irradiada: es el producto obtenido al someter la leche cruda entera a la acción de radiación ionizante de determinada longitud de onda, para destruir la totalidad de su flora patógena y la casi totalidad de su flora banal, sin alterar su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas u organolépticas³.

El proceso físico se denomina irradiación y es semejante al calentamiento ó a la congelación de alimentos para su conservación; la única particularidad es el tipo de energía empleada, que es menor a la empleada en el calentamiento y ocasiona menores cambios químicos en el alimento¹⁶.

La irradiación, de acuerdo con la práctica actual, se emplea con tres fines: 1. como alternativa de fumigación química en el control de insectos en ciertos alimentos como frutas y hortalizas; 2. para inhibir la germinación y otros mecanismos de deterioro autogenerados en el alimento y 3. para destruir las formas vegetativas microbianas, incluidas las que causan enfermedades en el hombre. Todo esto tiene como consecuencia un aumento en la seguridad y en la vida útil de los alimentos¹; sin embargo, según las normas colombianas, la leche irradiada tiene como fecha de vencimiento, 48 horas después de envasada³.

Desde el punto de vista de seguridad, el nivel de energía de la radiación aplicada al alimento, es la característica más importante que debe regularse con el objeto de evitar la posible formación de radioactividad inducida en el material irradiado. En la práctica, esto es solo de importancia cuando se toman en cuenta los tipos de instrumentos, ya que la mayoría de fuentes isotópicas empleadas habitualmente (⁶⁰Co, ¹³⁷Cs), emiten radiaciones de una energía ($\leq 1,33$ MeV), que es inferior a la energía productora de radioactividad inducida¹⁶. Esta forma de energía radiante pertenece al espectro electromagnético y son inducidos artificialmente, empleándose

fundamentalmente como fuentes de rayos gamma, correspondientes a una longitud de onda inferior a 100 nm¹.

3. Ultrapasteurizada (UHT), envasada asépticamente: es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche, a una temperatura no inferior a 132 °C durante un tiempo de 2 a 4 segundos, seguido inmediatamente de envasado aséptico en recipientes estériles a prueba de luz, impermeables y cerrados herméticamente, de tal manera que aseguran la ausencia de todas las formas de microorganismos vegetativos y esporulados, sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas u organolépticas³.

4. Ultrapasteurizada (UHT), envasada en alta higiene: es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche, a una temperatura no inferior a 132 °C durante un tiempo de 2 a 4 segundos, para destruir su flora patógena y la casi totalidad de su flora banal sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas u organolépticas, seguido inmediatamente de un enfriamiento rápido y envasado en condiciones de alta higiene en recipientes previamente higienizados, y herméticamente cerrados que aseguren la calidad del producto en refrigeración durante su vida útil³. Este proceso, denominado ultrapasteurización, permite obtener productos más duraderos (fecha de vencimiento: 6 meses contados a partir del día en el cual fue envasada)³, permaneciendo inalterables por más tiempo que el permitido por la pasteurización⁴.

En el calentamiento ultra-alto (UHT), se distinguen dos procedimientos: el calentamiento indirecto, que consiste en elevar la temperatura a 136-138 °C por 5-8 segundos y el calentamiento directo, donde la temperatura puede alcanzar de 140-145 °C por 2-4 segundos⁸.

En estos métodos se inactiva la peroxidasa y se desnaturaliza el 50 % de las proteínas del suero, además que ocurre la destrucción de muchas vitaminas⁴.

5. Esterilizada: es el producto obtenido al someter la leche cruda ó termizada, envasada herméticamente¹⁷, a una temperatura inferior a 115 °C, la cual debe mantenerse durante por lo menos 15 minutos, para lograr la destrucción de todas las formas de microorganismos vegetativos y esporulados, sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas u organolépticas³. El proceso denominado esterilización, da como resultado, productos conservables por 12 meses contados a partir del día en el cual fue envasada³.

En el proceso de esterilización, existe otro método en el cual la leche se somete a 120-130 °C durante 8-12 minutos en autoclave, una vez envasado⁸.

Estos tratamientos de esterilización deben garantizar una esterilidad completa y por ello, se utilizan únicamente en la elaboración de productos lácteos conservados; en general, las altas temperaturas empleadas en este tratamiento, ocasionan profundas modificaciones físico-químicas y organolépticas, y hacen que se presente una alta desnaturalización de las proteínas y pardeamiento ó efecto de Maillard¹⁰.

2.4 CALIDAD DE LA LECHE

El concepto de calidad de la leche involucra los requisitos de su utilización. Una leche para ser aceptable, debe estar libre de gérmenes patógenos y debe además, mantener una buena presentación, alto valor nutritivo y estar limpia y libre de materias extrañas y sedimentos¹⁰.

Otros factores importantes, que influyen sobre la calidad de la leche, son: la selección del ganado, que corresponde a animales clínicamente sanos, no sólo

por el rendimiento global de la leche, sino también por la cantidad y probablemente, la calidad de las proteínas; la alimentación de la vacas lecheras; época de lactancia; número de ordeños y la higiene en el momento del ordeño⁹.

Dentro de las razas especializadas en producción de leche, se pueden mencionar, en orden de mayor a menor producción: Holstein, Pardo Suizo y Ayrshire, que contienen de 3 a 4 % de grasa y Guernsey y Jersey, con un contenido de 4-5,5 %. El contenido graso, es uno de los factores que principalmente afectan a la composición de la leche, pues las razas que producen mayor cantidad, son las que menor contenido porcentual de grasa presentan y viceversa¹⁰.

Es importante recordar que la mayoría de los factores anteriormente mencionados, afectan la calidad porcentual de la grasa de la leche¹⁰, ya que al aumentar el número de ordeños, aumenta la leche producida y la cantidad de grasa, como consecuencia de la excitación de la mama. El proceso de obtención de la leche se denomina ordeño, y debe llevarse a cabo en condiciones de total higiene del ordeñador, de los utensilios, de limpieza de la ubre, de un medio ambiente adecuado, con pisos secos, buena ventilación, drenaje y conservación hasta el momento de entrega en la planta, incluyendo la cadena de transporte¹⁰.

Es necesario aclarar que la calidad de la leche en el momento de llegar a la planta procesadora, puede verse afectada por aspectos como¹⁰:

- Tipo de transporte utilizado desde la granja hasta la planta.
- Distancia existente entre la granja y la planta.
- Limpieza de los recipientes de transporte.
- Temperatura mantenida durante el transporte¹⁰.

Con base a estos aspectos, es posible estimar la calidad de la leche, y conocer así la relación entre la microflora presente en la leche cruda y la leche procesada

térmicamente utilizando los diferentes tratamientos de higienización; además, deben contemplarse otros aspectos que deben determinarse en el momento de la recepción en la planta procesadora y/o en el laboratorio, tales como¹⁰:

- Examen de limpieza física y características organolépticas.
- Pruebas físico-químicas que incluyan las determinaciones de temperatura, acidez, grasa, densidad y adulterantes, según el programa de laboratorio.
- Determinación del potencial de óxido-reducción y tiempo de reducción del azul de metileno.
- Examen microbiológico, que se realiza con el fin de determinar el contenido de microorganismos, especialmente de coliformes totales, fecales y recuento total de mesófilos¹⁰.

Es importante considerar que la calidad de la leche comercial, también puede ser relacionada con la cantidad de calor aplicado durante su procesamiento⁷ y es por ello, que se hace necesario considerar una serie de análisis físicos y químicos que permitan calificarla como apta.

2.4.1 Análisis físicos, químicos y microbiológicos: la leche, una vez recepcionada en la planta procesadora, es sometida a una serie de análisis de plataforma, con el fin de aceptarla o rechazarla; de acuerdo con el resultado, posteriormente se obtienen muestras para poder efectuar los análisis químicos que permitan determinar la calidad de la materia prima¹⁰.

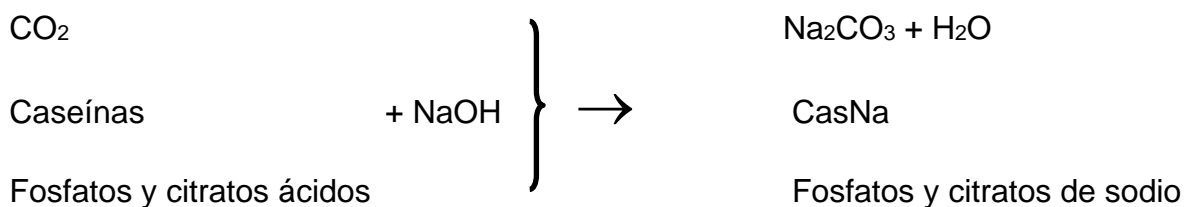
Dentro de los análisis de plataforma, están el verificar la temperatura, especialmente cuando se ha convenido la compra de leche refrigerada; la leche se somete a un proceso de depuración física para retirar todas las impurezas que lleva en suspensión y posteriormente, se le realizan pruebas organolépticas que consisten básicamente en pruebas de aroma y sabor¹⁰.

Los métodos analíticos para llevar a cabo los análisis químicos, están perfectamente establecidos y se realizan para asegurar el cumplimiento de las exigencias legislativas sobre composición mínima y garantizar que la leche no está adulterada ni contaminada; generalmente, se efectúan sobre la leche antes y después de su tratamiento¹⁸. Antes de tomar porciones para cada determinación analítica correspondiente a los análisis químicos, la muestra de leche se debe mezclar perfectamente, mediante inversiones lentas y continuas del recipiente que la contenga, o vaciándola con lentitud en un vaso de precipitados y de nuevo a otro vaso; este proceso debe repetirse varias veces¹¹.

Es necesario también, realizar un examen rutinario de la leche que comprenda la lectura de la densidad para obtener una estimación de posibles fraudes por aguado, ya que con el aguado, la densidad de la leche puede disminuir y salirse del rango permisible; por el contrario, la densidad puede aumentar con el descremado y con la disminución de la temperatura¹⁰.

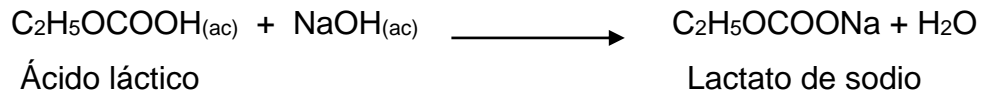
De igual manera, se puede valorar el grado en que se ha agriado la leche, mediante la determinación de la acidez¹⁸. La acidez titulable, expresa la cantidad de álcali necesario para cambiar el pH de 6,6 a 8,4; este valor de acidez constituye la acidez natural o aparente que no se debe a la presencia de ácido láctico¹⁸ (1) y (2). En principio, es una medida de la capacidad amortiguadora de la leche, debido especialmente a las proteínas y a las sales¹⁸.

Reacciones debidas a la acidez natural (1)



Reacción debida a la acidez desarrollada

(2)



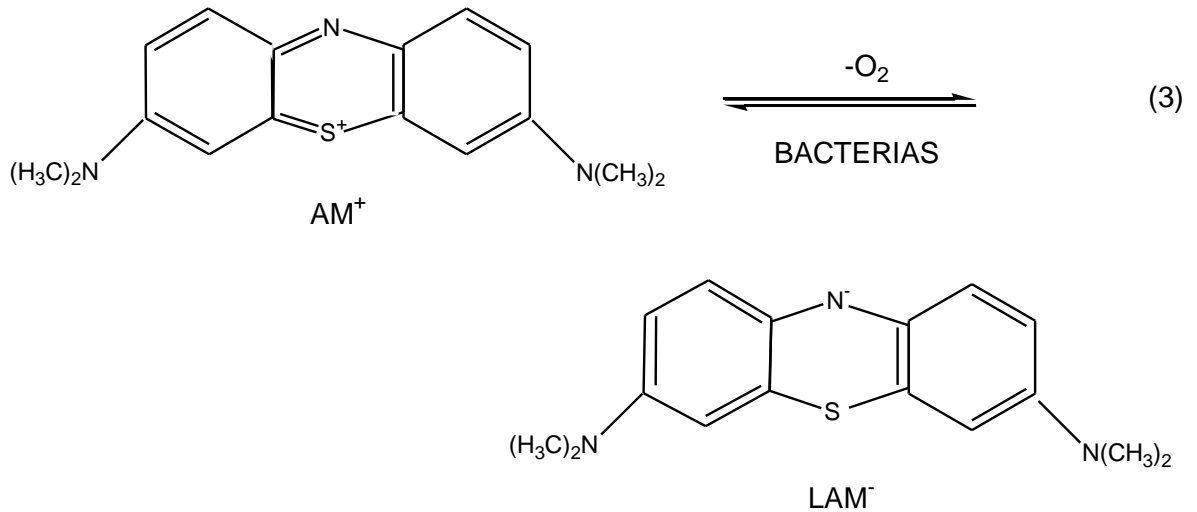
Es de resaltar que las determinaciones de pH, pueden ser mucho más importantes que las de acidez titulable, ya que la acción de enzimas, precipitación de caseínas y gusto ácido, están relacionados directamente con los valores de pH¹⁸.

La materia grasa reúne un conjunto de numerosas sustancias de estructura química diferente, todas ellas solubles en disolventes orgánicos apolares; la extracción de la materia grasa y los métodos utilizados para su determinación, se basan en esta solubilidad¹⁰; un método rápido y de alta exactitud es el método Gerber, que consiste en destruir los componentes orgánicos de la leche (excepto la materia grasa), con ácido sulfúrico concentrado; luego, mediante la adición de alcohol amílico se rompen las emulsiones y se previene la carbonización de las mismas; se centrifuga en unos tubos llamados butirómetros y la materia grasa se separa fácilmente, determinando así, su contenido en porcentaje¹⁰.

El contenido de sólidos totales ó extracto seco y el contenido de sólidos no grasos o extracto seco desengrasado, se calcula como porcentaje (p/p) mediante la modificación de la fórmula de Richmond, basada en los valores de densidad y materia grasa¹¹.

Es necesario además, efectuar la prueba del azul de metileno, para determinar la calidad bacteriológica de la leche¹⁰; esta prueba depende de que la actividad reductora de los microorganismos y de las sustancias reductoras de la leche, logren un descenso del potencial redox. La mayor parte de la actividad reductora de las bacterias, se utiliza para eliminar todo el oxígeno disuelto en la leche, consiguiendo así, la reducción completa del tinte (3), ya que como es sabido, el

oxígeno de la leche, es empleado por las bacterias para su respiración. Este descenso del potencial redox se valora visualmente mediante el cambio de color del azul de metileno adicionado a la leche¹¹.

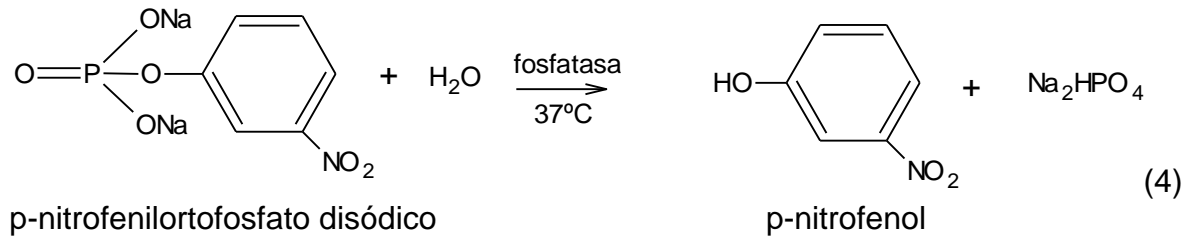


Para realizar la interpretación de la prueba, la cual se basa en el tiempo de viraje ó tiempo de reducción del azul de metileno, y que concluye sobre el estado de conservación y pureza de la muestra, se tuvo en cuenta la siguiente escala de clasificación¹⁰:

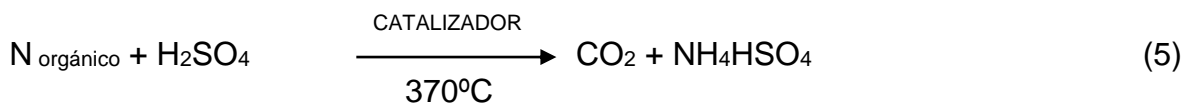
1. Leche muy mala: si no se conserva el color por más de 20 minutos
2. Leche mala: si conserva el color de 20 minutos a 2 horas.
3. Leche calidad mediana: si conserva el color de 2 a 5 ½ horas.
4. Leche de primera calidad: si conserva el color por más de 5 ½ horas.

Otro procedimiento rutinario, común para la leche pasteurizada, es la valoración del grado de pasteurización, a partir de los resultados de la prueba de fosfatasa. Esta prueba se basa en que las fosfatasas son enzimas que están invariablemente presentes en la leche cruda y son inactivadas durante la pasteurización; la prueba incluye la incubación de la leche con p-nitrofenilortofosfato disódico en condiciones

alcalinas. Cuando la leche contiene fosfatasa, se produce un color amarillo, debido a la formación de p-nitrofenol (4); después de este tiempo, se observa si el color blanco inicial permanece inalterado ó si hubo desarrollo de un color amarillo intenso en el tubo que contiene la muestra, lo cual indicaría la presencia de la enzima activa¹¹.



Otras determinaciones necesarias son el contenido de proteína y cenizas las cuales se realizan por el método Kjeldahl e incineración del residuo seco, respectivamente¹¹. El contenido de nitrógeno se determina por combustión líquida, en la que el nitrógeno se convierte en sulfato de amonio (5), que al reaccionar con álcali libera amoníaco (6), el cual se destila y se recoge en ácido bórico (7); el borato de amonio formado, se titula con una disolución ácida normalizada (8) y el porcentaje de nitrógeno obtenido debe ser multiplicado por el factor de conversión correspondiente a la leche (6,38), para obtener el porcentaje de proteína respectivo¹⁰.



2.5 TRATAMIENTO TÉRMICO Y ACCIÓN DEL CALOR SOBRE LOS ALIMENTOS

Un tratamiento térmico, junto a su capacidad de destrucción microbiana por efectos del calor, tiene también una acción sobre los demás componentes del alimento, principalmente sobre las enzimas, proteínas, vitaminas, etc., ya que pueden llegar a afectar tanto a sus propiedades físicas de color, forma, consistencia, etc., como a sus propiedades químicas, lo cual se ve reflejado en la reducción del valor nutritivo del alimento, debido a la formación de compuestos que no estaban presentes¹⁵.

El efecto del calor sobre la flora del alimento se le denomina destrucción térmica, mientras que el efecto sobre el resto de sus componentes se le denomina cocción. Dentro del proceso de cocción, se encuentra la acción del calor sobre el agua de constitución, sobre los lípidos, glúcidos, proteínas y vitaminas¹⁵.

Dada la complejidad de la acción de los tratamientos térmicos sobre los alimentos, es necesaria su optimización; para ello, los tratamientos térmicos deben ajustarse de forma que se consigan los resultados deseables y se minimicen los indeseables, obteniendo así alimentos de calidad y alto valor nutricional¹⁵.

2.5.1 Efectos del tratamiento térmico sobre la calidad de la leche: el calentamiento es una operación que se realiza en la mayoría de los diferentes tipos de procesado y que incluye la pasteurización, esterilización y concentración¹². Cada uno de los anteriores tratamientos térmicos, modifica las propiedades de la leche, ya que se inducen diferentes cambios químicos, principalmente en la fracción proteica y en la lactosa; sin embargo, cada constituyente de la leche tiene un grado de sensibilidad diferente a dichos tratamientos, así, por ejemplo, las enzimas en forma libre y las proteínas del suero

son mucho más lábiles al calor que las caseínas, y éstas a su vez que los lípidos y los carbohidratos⁴.

Los tratamientos térmicos producen en la leche de partida modificaciones deseables e indeseables; entre las deseables están la destrucción de microorganismos o esporas y la inactivación de enzimas, lo que aumenta la vida comercial del producto; entre los indeseables se encuentran los cambios en los componentes de la leche (proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales), así como la formación de nuevas sustancias que alteran el aroma, el color, la consistencia y reducen el valor nutritivo del producto⁵.

2.6 INDICADORES DE TRATAMIENTO TÉRMICO

El deterioro de los productos lácteos no sólo depende del pH, sino también del calentamiento (de su duración como de su intensidad) y de la concentración de los constituyentes del producto, que influyen las reacciones químicas y bioquímicas generadas por el calor¹⁹.

Durante el calentamiento, toman lugar diferentes reacciones deteriorativas que involucran a la lactosa. Estas ocurren en diferentes grados, dependiendo de las condiciones del proceso²⁰, y permiten relacionar la calidad de la leche con la cantidad de calor aplicado durante su procesamiento, para lo cual es necesario emplear indicadores de tratamiento térmico, como una medida de control del proceso y para identificar el tipo de tratamiento empleado⁷.

Dos tipos de reacciones químicas pueden ser usadas como indicadores para la evaluación del tratamiento térmico:

- Indicador tipo I: incluye la degradación, desnaturalización e inactivación de compuestos termolábiles como proteínas del suero, enzimas y vitaminas.

- Indicador tipo II: incluye la formación de nuevas sustancias como lactulosa o productos de la reacción de Maillard¹⁹.

La lactulosa, resultante de la isomerización de la lactosa vía rearrreglo Lobry de Bruyn-Alberda Van Ekenstein, fue propuesta por la federación Internacional de lechería (International Dairy Federation) y la Unión Europea (European Union), como un parámetro capaz de diferenciar entre diferentes procesos de higienización²¹; por lo tanto, puede ser usada como un indicador térmico y para distinguir entre leches UHT, pasteurizadas y esterilizadas²².

Otro mecanismo involucrado en la formación de nuevas sustancias, es la reacción de Maillard, la cual conduce a la disminución del valor nutricional de proteínas y a la formación de compuestos pardos en la leche. El grado de la reacción puede ser evaluado por la determinación del contenido de lactulosa y furosina, siendo este último el principal compuesto estable en la primera etapa de la reacción de Maillard^{22, 23}.

La reacción de Maillard (RM), ha sido objeto de especial interés en el estudio del efecto del tratamiento térmico sobre la calidad proteica de la leche, ya que los diferentes tratamientos térmicos a los que se somete la leche, conducen a diferentes etapas de dicha reacción⁵.

Los indicadores del deterioro de la leche según la RM, se pueden clasificar de la siguiente forma (Tabla 6).

Tabla 6. Indicadores del deterioro de la leche según la Reacción de Maillard (RM)⁵.

Indicadores Específicos de la RM	Indicadores no específicos de la RM
No deseables: Furosina (FUR). Lisinoalanina (LAL). Histidinoalanina (HAL). Furfurales. Melanoidinas. Pérdida de nutrientes: lisina disponible.	Galactosa Lactulosa Sustancias reductoras de proteína Desnaturalización de proteínas Digestibilidad “in vitro” de la proteína. Otros: pH, viscosidad, ácidos grasos libres.

2.7 REACCIONES DE DEGRADACIÓN DE LA LACTOSA

La concentración de lactosa en la leche cruda, juega un importante papel en la formación de lactulosa²⁴. Dos rutas de degradación de la lactosa han sido establecidas:

1. La reacción de isomerización de la lactosa, la cual a través de la transformación Lobry de Bruyn-Alberda Van Ekenstein (transformación LA) produce lactulosa con la subsiguiente degradación a galactosa, ácido fórmico y compuestos C5/C6; dentro de los posibles compuestos C5 inestables, están la deoxiribosa, 3-deoxipentulosa y furfural; los compuestos C6 formados, se asume que son intermediarios tales como deoxiosonas no identificadas, probablemente porque su alta reactividad, resulta en la formación de otros numerosos compuestos²⁵.

2. La reacción de Maillard, en la cual la lactosa interactúa con los residuos de la lisina de las proteínas, para formar lactulosil-lisina, seguida por la degradación del

producto de Amadori que produce galactosa y ácido fórmico como productos principales²⁵.

Cuantitativamente, la ruta de transformación Lobry de Bruyn-Alberda Van Ekenstein (transformación LA), sugerida por Montgomery y Hudson (1930)⁶, es más importante que la reacción de Maillard²⁵.

Es importante recalcar que los monosacáridos en medio alcalino y a temperaturas moderadas, sufren transformaciones reversibles e irreversibles, como se muestran en el diagrama 1. Las reacciones reversibles incluyen ionización, mutarrotación y enolización; la isomerización vía reacción de enolización, está acompañada por la transformación irreversible del monosacárido a ácido carboxílico; esto es conocido generalmente como degradación alcalina; la enolización, seguida por isomerización es conocida como transformación LA. La formación de ácidos carboxílicos, puede darse por varios caminos⁶.

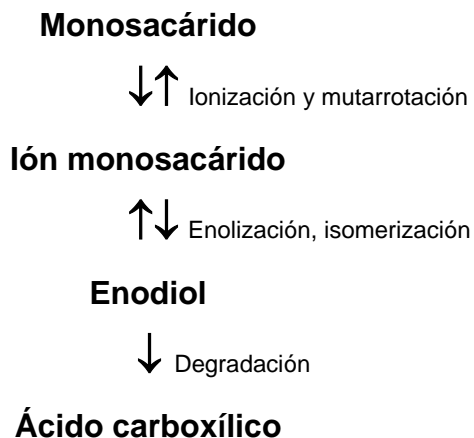


Diagrama 1. Transformación de monosacáridos en medio alcalino

El mecanismo de la transformación LA de la lactosa a lactulosa se muestra en la figura 4.

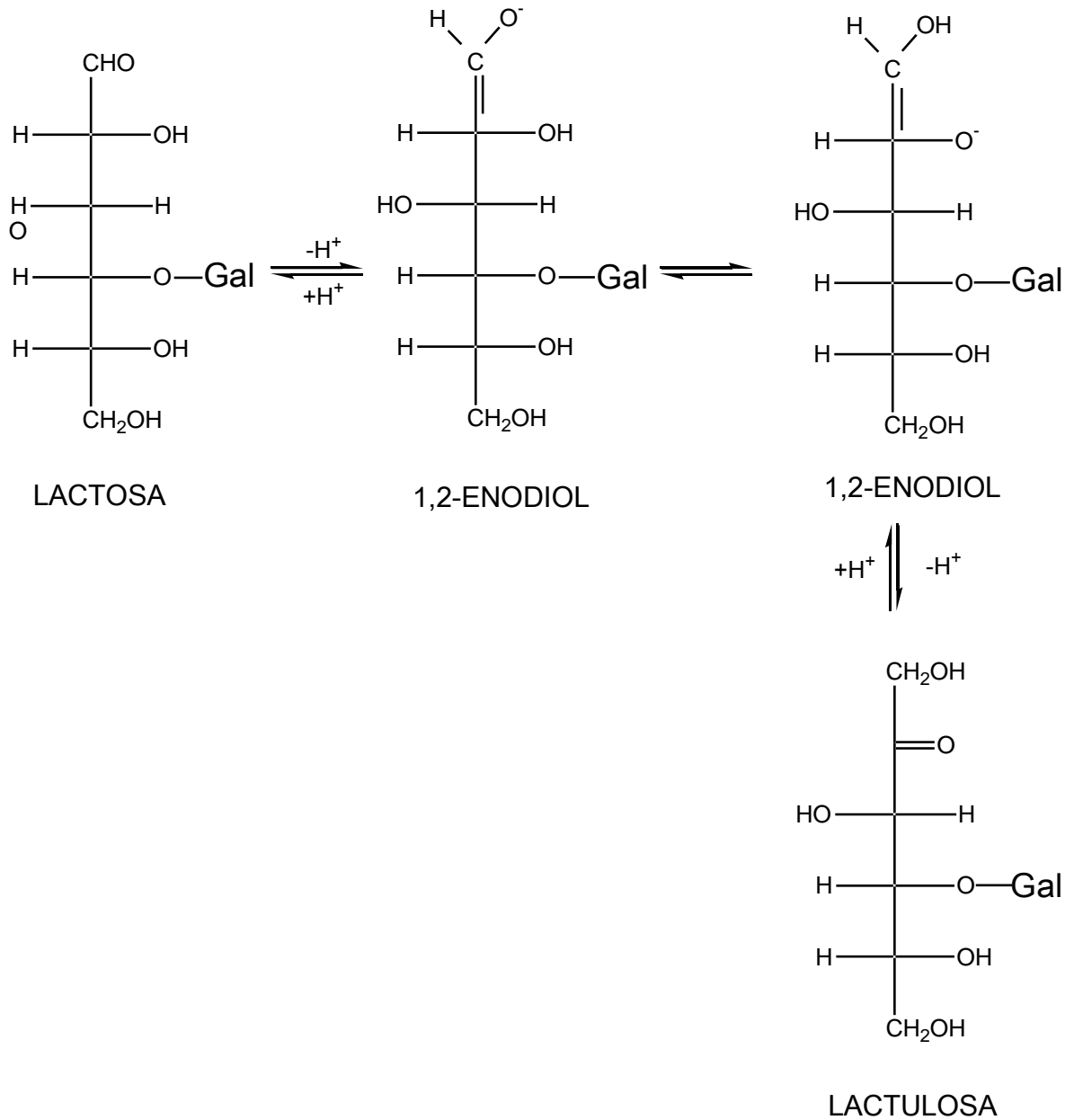


Figura 4. Transformación Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein de lactosa a lactulosa⁶.

2.8 LACTULOSA

La lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa), es un disacárido formado por los azúcares D-galactosa y D-fructosa, los cuales están unidos por un enlace β -glicosídico²⁶; a continuación se muestra su estructura en la figura 5.

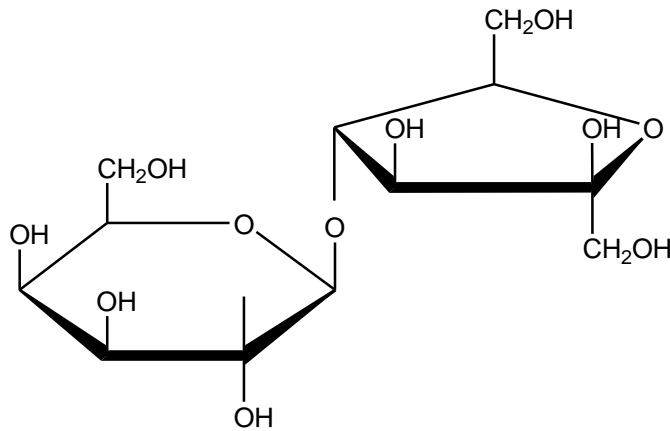


Figura 5. Lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa)

El enlace β -glicosídico, hace que los azúcares que componen este disacárido sean resistentes a la hidrólisis de la mucosa intestinal; sin embargo, la lactulosa es fermentada por un limitado número de bacterias en el colon que la transforman en ácido láctico y acético y que pueden generar cambios en el ecosistema del colon a favor de algunas bacterias, tales como, lactobacilos y bífidobacterias, quienes pueden conferir algunos beneficios a la salud²⁶.

Teóricamente existen cinco posibles isómeros de la lactulosa, con la fructosa existiendo como α ó β -piranosa, α ó β -furanosa ó como un anillo abierto²⁷. Sus estructuras se indican en la figura 6.

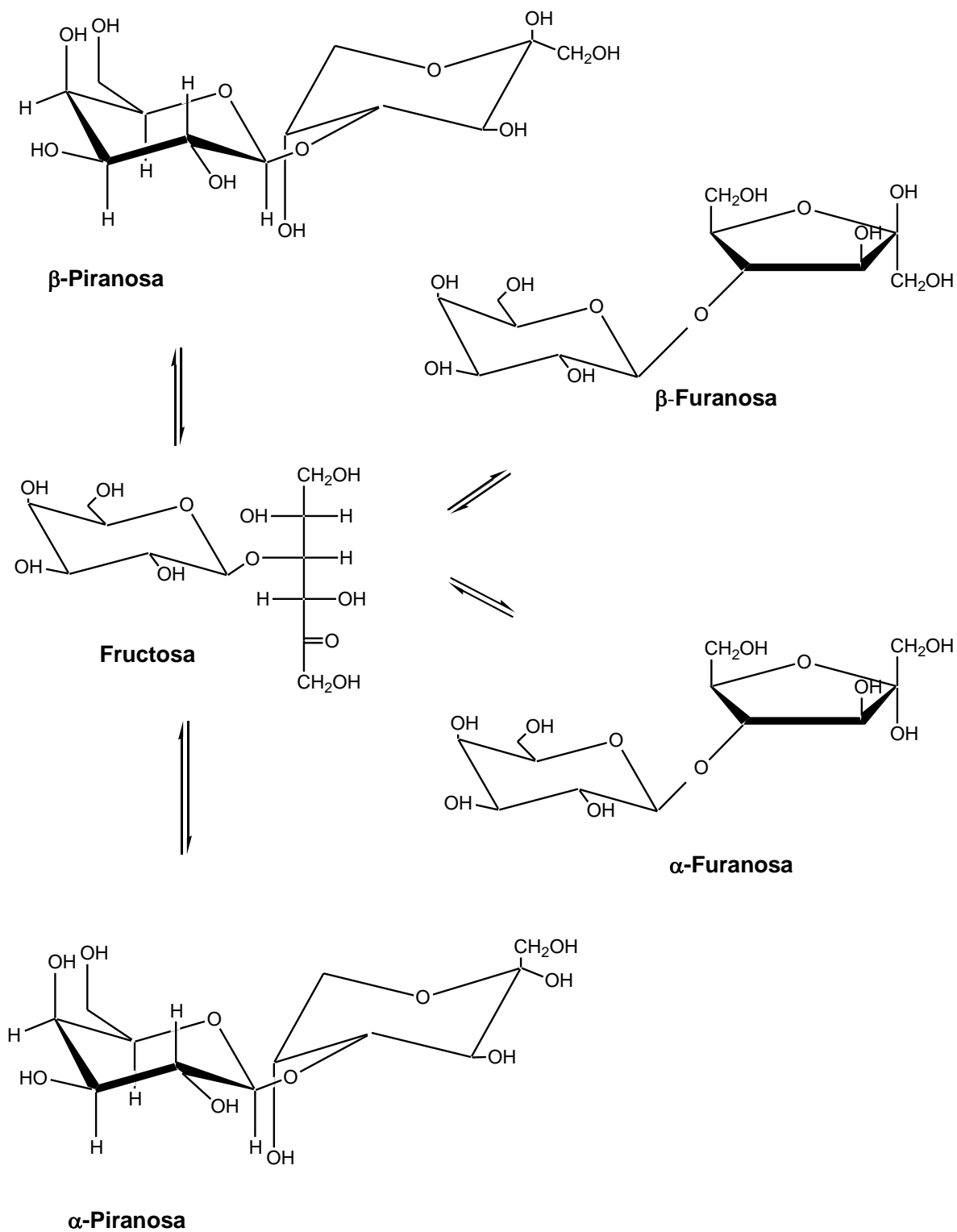


Figura 6. Isómeros de la lactulosa

La lactulosa fue aislada por primera vez por Montgomery y Hudson (1930) de una solución de lactosa en agua de cal saturada e incubada a 35°C durante 36 horas²⁷.

Se caracteriza porque está ausente en leche cruda y se forma durante el tratamiento térmico al que se somete la leche como producto de la isomerización alcalina de la lactosa, catalizada por el grupo ϵ -amino libre de la lisina²⁴.

Puede encontrarse en dos formas: como lactulosa libre en solución y como N-deoxilactulosil-L-lisina, que está covalentemente enlazada al grupo amino de las proteínas de la leche²⁴.

La formación de este disacárido en leches calentadas depende del tiempo y de la temperatura de calentamiento y es también afectada significativamente por el pH del medio²⁸.

En general, los niveles máximos permitidos de lactulosa en leche, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Niveles máximos permitidos de Lactulosa^{11, 28}.

TIPO DE LECHE	mg/L
Cruda	Ausente
Pasteurizada	10 a 20
UHT	≤ 600
Esterilizada	> 600

2.9 ANÁLISIS DE LACTULOSA

El conocimiento exacto de la cantidad de lactulosa que puede encontrarse en la leche procesada, es de interés, especialmente en aquellas dietas en las que la leche constituye el componente principal.

Diversos métodos han sido usados para la determinación y cuantificación de la lactulosa en leche y productos lácteos; el principal problema con la cuantificación, proviene del hecho que la concentración de lactosa está en extremo exceso, por lo cual, muchos métodos incluyen un previo paso de separación, ó el uso de reacciones específicas de aldosas para remover la lactosa y cuantificar la lactulosa por un método general para carbohidratos ó un método específico para cetosas²⁴; sin embargo, los métodos cromatográficos parecen ser particularmente convenientes para la medida precisa de pequeñas cantidades de lactulosa presentes en leches calentadas²⁹.

Numerosos métodos cromatográficos han sido propuestos para el análisis de lactulosa en presencia de otros carbohidratos³⁰. La técnica de CCF es empleada como un procedimiento rápido para el análisis cualitativo y ha sido una de las primeras técnicas elegidas para el análisis de carbohidratos; sin embargo, ha sido escasamente utilizado para el análisis de lactulosa. Generalmente se realiza sobre capas de sílica gel impregnadas con sales inorgánicas; la separación es entonces influenciada no sólo por la adsorción, sino también por la interacción del azúcar con las sales. Para lograr la separación de la lactulosa de los otros azúcares, debe adicionarse ácido bórico, acetato de sodio y bisulfito de sodio a la sílica gel; la estabilidad de los complejos formados varían con el solvente empleado, siendo las mezclas de agua, isopropanol o n-butanol, los eluentes más empleados con flujo ascendente y descendente^{29, 30}.

Actualmente, los métodos más utilizados están basados en el uso de la cromatografía de gases (CG) y de la cromatografía de líquidos (CLAR)³¹.

La técnica de CLAR es una técnica muy prometedora, aplicada al análisis de mono y disacáridos, puesto que presenta ciertas ventajas inherentes tales como: capacidad para detectar carbohidratos directamente sin derivatización, ausencia de separación de anómeros, simplicidad en la naturaleza de la técnica³², las columnas son principalmente en fase-reversa, pero también son ensayadas columnas de sílica con modificaciones de eluente²⁹. Sin embargo, algunos carbohidratos no absorben cerca de los 200 nm y deben ser derivatizados para permitir aumentar la sensibilidad a la detección UV; el índice de refracción también puede ser usado para la detección de azúcares, pero la señal característica de respuesta es baja en sensibilidad²⁹.

En recientes años, la detección amperométrica pulsada (PAD) ha sido empleada en el análisis de azúcares y acoplada con CLAR, contrarresta muchos de los problemas previamente encontrados en el análisis de lactulosa en bajas concentraciones; el uso de detección amperométrica permite límites de detección en el rango de los femtomoles²⁹.

La CG proporciona mejor resolución de la lactulosa con respecto a otros carbohidratos y la reproducibilidad y sus límites de detección son adecuados en muchos casos^{29, 30}; representa la alternativa preferida cuando se emplean mezclas altamente complejas a bajos niveles, pero los múltiples procedimientos implicados durante la extracción y preparación de derivados volátiles, pueden ocasionar pérdidas por manipulación, derivatización incompleta y formación de anómeros³²; sin embargo, la posibilidad de reducir el número de picos, ha sido investigada por la conversión del azúcar a oximas ó metil-oximas combinadas con trimetilsililación.

La lactulosa es bien resuelta de otros azúcares en columnas empaquetadas como OV-17 y OV-25; cuando se emplean columnas capilares, un pico agudo y un segundo pico ancho aparecen con frecuencia como un hombro²⁹.

Dentro de los métodos que incluyen etapas previas de separación ó utilizan reacciones específicas de aldosas para eliminar la lactosa y posteriormente cuantificar la lactulosa, están los métodos espectrofotométricos; el primer método reportado por Adachi (1959)²⁷, consistió en desproteinizar la leche usando el reactivo cisteína-HCl-carbazol-H₂SO₄ y la concentración fue determinada por la densidad del color rosa-violeta desarrollado. Después, este mismo autor (1965)²⁷ empleó la reacción de metilamina con lactulosa, la cual involucra un paso preliminar para eliminar la lactosa por oxidación a ácido aldónico con periodato, seguido por una extracción por intercambio iónico.

El método de la antrona de Zagrodzki y otros (1968)²⁷, fue establecido para la reacción selectiva con cetosas; ellos emplearon antrona en ácido fosfórico-ácido acético, para determinar lactulosa en la presencia de aldosas (Figura 7), en una solución-etanólica al 92 % y establecieron que la ley de Beer, fue observada a 427 nm para concentraciones de lactulosa de 0,5-1,5 mg/mL. Resultados similares fueron reportados por Zagrodzki y Król (1972)²⁷, pero ellos también establecieron que la antrona reacciona con el 5-hidroximetilfurfural obtenido de la deshidratación del carbohidrato.

Entre otros métodos, en 1971, Vachek³³ usó ácido sulfúrico al 60 % para estimar lactulosa en jarabes de lactulosa; en 1974, mejoró el método usando como reacti-

-
- La antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno), es un reactivo aromático empleado para la determinación de carbohidratos, mediante la formación de un complejo coloreado con una determinada longitud de onda de absorción.

vo cisteina-HCl-H₂SO₄. Este método es aplicable solo a jarabes de lactulosa puros, debido a la interferencia de lactosa³³. Kravchenko y otros (1977)²⁷, aprovecharon la baja solubilidad de la lactosa en etanol al 92 % para purificar mezclas de lactosa-lactulosa, sin obtener resultados satisfactorios, por lo cual emplearon finalmente la reacción de la antrona para la determinación de lactulosa.

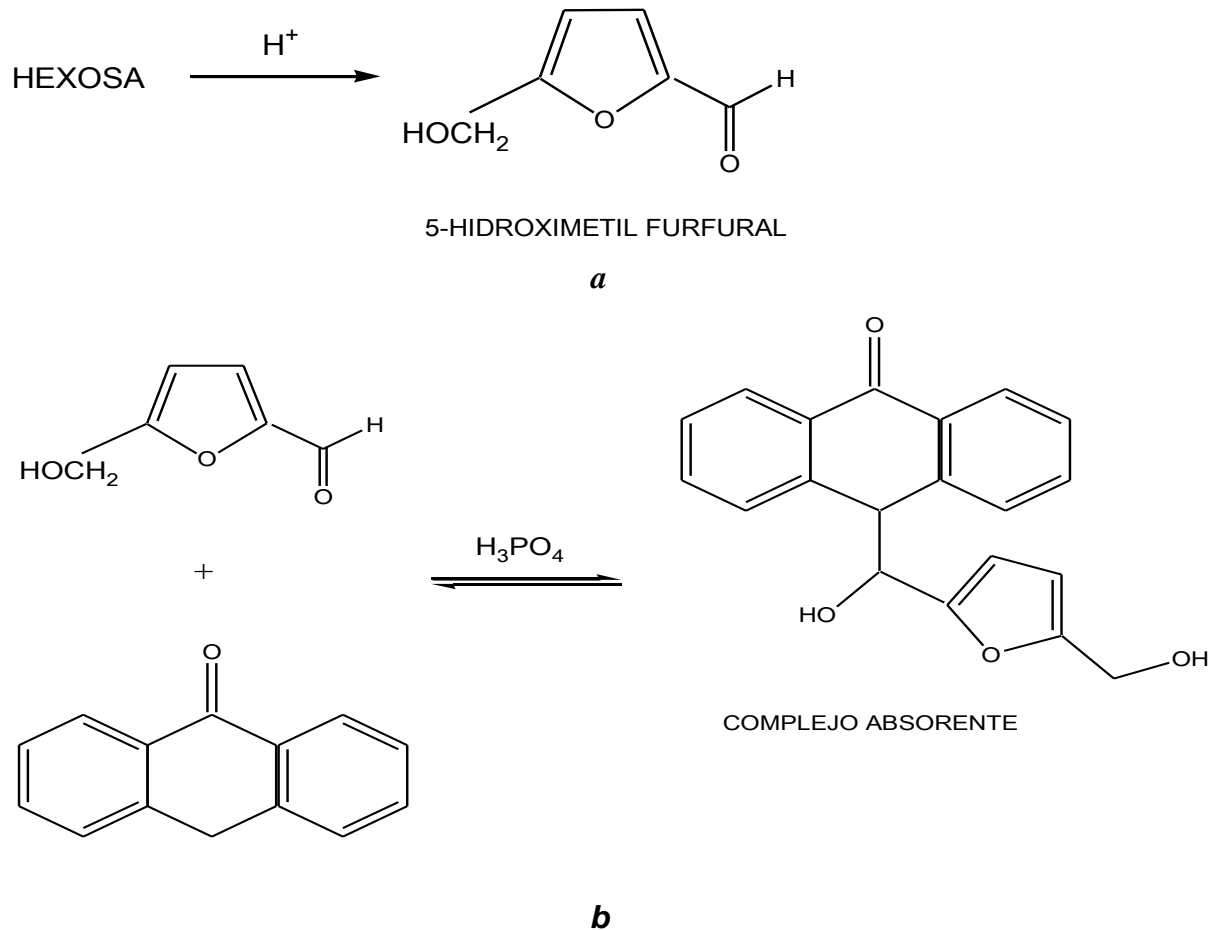


Figura 7. a) Producto de deshidratación del carbohidrato; b) Reacción de la antrona con el derivado furfural

Nagendra y Venkat (1991)³³, mejoraron el método colorimétrico descrito para la estimación de lactulosa en mezclas de lactosa-lactulosa, empleado por Zagrodzki y otros en 1968. El método de la antrona fue modificado variando las concentraciones de alcohol y de ácido acético adicionadas a la mezcla de

reacción, con el fin de mejorar la sensibilidad; los resultados obtenidos incrementaron en el doble la sensibilidad, además de facilitar el incremento en el volumen de muestras empleado para el análisis.

Adicionalmente, existen métodos enzimáticos para la determinación de lactulosa, los cuales incluyen la remoción de grasa y de proteínas, seguido por la adición de β -galactosidasa para hidrolizar tanto la lactosa como la lactulosa. La glucosa formada es removida por oxidación enzimática con glucosa oxidasa y la fructosa es entonces fosforilada a fructosa-6-fosfato; la fosfoglucoisomerasa convierte a este en glucosa-6-fosfato, la cual es reducida por NADP. El cambio en la absorción a 340 nm antes y después de la adición de la última enzima, es proporcional a la lactulosa presente; la principal desventaja del método es el alto consumo de enzimas²⁹.

Actualmente se referencian diversos métodos y técnicas para el análisis de lactulosa, tales como otros métodos colorimétrico - enzimáticos, técnicas como pH diferencial²¹, microdiálisis y biosensores³⁶ y espectroscopía de fluorescencia de fase frontal²², entre otros.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el contenido de lactulosa como un indicador de calidad de leches comerciales de consumo procesadas térmicamente, mediante espectrofotometría UV-visible.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la composición de la leche mediante pruebas fisicoquímicas que permitan la evaluación preliminar de la calidad de la leche.

Establecer un nivel de confianza para la caracterización preliminar de la leche, mediante un apropiado ejercicio de intercalibración con otro laboratorio

Implementar la técnica de espectrofotometría UV-visible, y aplicar la metodología adecuada para la determinación y cuantificación de lactulosa en leches procesadas térmicamente.

Obtener parámetros que sirvan como criterio de confianza del método empleado en la cuantificación de lactulosa y realizar el tratamiento estadístico que garantice la confiabilidad de los resultados para dicha aplicación.

4. METODOLOGÍA

4.1 EQUIPOS, MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO Y REACTIVOS

4.1.1 Equipos: la estandarización de la metodología desarrollada en este trabajo, se realizó empleando los siguientes equipos:

- Balanza analítica, METTLER, AE 200 (200 g/0,0001 g)
- Horno, WTB BINDER (0-230 °C)
- Horno de calcinación, TERRIGENO, D-8 (25-1200 °C)
- Planchas, CORNING, PC-420 (Temperatura: 25-550 °C; Agitación: 60-1100 rpm)
- pH-metro, METTLER TOLEDO, 8603 acoplado a un electrodo, MT INLAB 413
- Baño maría, ISOTEMP 205, FISHER SCIENTIFIC (0-100 °C)
- Equipo de digestión, BUCHI, K-424
- Scrubber, BUCHI, B-414
- Equipo de destilación, BUCHI, K-314
- Centrífuga, Dr. N. GERBER, K-56A (1380 rpm)
- Nevera, HACEB
- Espectrofotómetro UV-visible, INTRALAB-DMS 100
- Espectrofotómetro UV-visible, THERMO GENESYS 6
- Vortex, THERMOLYNE M37615

4.1.2 Material de vidrio y plástico: para el desarrollo de la metodología, se empleó como material de apoyo los siguientes implementos:

- Recipientes plásticos de 5 L
- Nevera de icopor (ó material isotérmico)
- Algodón
- Viales de vidrio de 250 mL
- Viales de vidrio ámbar de 30 mL
- Balones aforados de 10 mL
- Pipetas aforadas de 11 mL Gerber
- Pipetas aforadas de 10 mL
- Pipetas aforadas de 5 mL
- Pipetas aforadas de 2 mL
- Pipetas aforadas de 1 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Erlenmeyers de 100 mL
- Beakers de 600 mL
- Beakers de 100 mL
- Crisol de porcelana
- Desecador
- Microbureta de 10 mL
- Probeta de 250 mL
- Termómetro
- Butirómetros, Dr. N. GERBER, Escala 0-8 %
- Lactodensímetro, ASSISTENT (15-40 grados lactodensímetros según Quevenne; 0-30 °C)
- Tubos de ensayo de 20 mL
- Tubos de digestión Kjeldahl

4.1.3 Reactivos: para la estandarización de la metodología desarrollada en este trabajo, se utilizaron los siguientes reactivos y solventes de grado analítico:

- Ácido acético glacial, 99,8 %, MERCK
- Ácido bórico comercial
- Ácido clorhídrico, 37 %, MERCK
- Ácido o-fosfórico, 85 %, FISHER SCIENTIFIC
- Ácido sulfúrico, 96 %, MERCK
- Ácido sulfúrico para Gerber, 91 %, MERCK
- Alcohol amílico, 99,5 %, MALLINCKRODT
- Alcohol etílico absoluto, 99,8 %, CARLO ERBA
- Antrona, 99 %, MERCK
- Azul de metileno, MERCK
- Bicarbonato de sodio, 99,5 %, MERCK
- Carbonato de sodio anhidro, 99,9 %, MERCK
- Catalizador proteína: K_2SO_4 , 99 %, CARLO ERBA; $CuSO_4$, 98 %, CARLO ERBA; TiO_2 , 99 %, MERCK
- Fenolftaleína, CARLO ERBA
- Hidróxido de sodio comercial
- Hidróxido de sodio, 98 %, CARLO ERBA
- Hidróxido de potasio, 98 %, CARLO ERBA
- Indicador de Tashiro: Azul de metileno, MERCK y rojo de metilo, CARLO ERBA
- Lactulosa, 95 %, SIGMA
- Metanol, 99,9 %, MALLINCKRODT
- Mezcla sulfocrómica: $K_2Cr_2O_7$ 98 %, MOL LABS y H_2SO_4 , 96 %, MERCK
- p-Nitrofenilortofosfato-disódico, 98 %, MERCK
- Rojo de metilo, CARLO ERBA
- Sulfato de cobre, 98 %, CARLO ERBA
- Sulfato de potasio, 99 %, CARLO ERBA

4.1.3.1 Soluciones y mezclas: para el desarrollo del trabajo, se utilizaron las siguientes soluciones:

- Antrona: 100 mg antrona en 6 mL de ácido acético caliente:12 mL etanol:1,4-ácido ortofosfórico.
- Catalizador de proteína: se pesaron 10 g de K_2SO_4 , 0,3 g de $CuSO_4$ y 0,3 g de TiO_2 , se mezclaron y maceraron.
- Indicador de Tashiro: se mezclaron 25 mL de solución alcohólica de azul de metileno al 0,05 % y 25 mL de solución alcohólica de rojo de metilo al 0,1 %.
- Mezcla sulfocrómica: $K_2Cr_2O_7$ al 10 % en H_2SO_4 concentrado.
- Solución tampón de carbonato-bicarbonato de sodio: se disolvieron en agua destilada 0,35 g de Na_2CO_3 anhidro y 0,15 g de $NaHCO_3$, y se aforó a 100 mL.
- Solución p-Nitrofenilortofosfato-disódico 0,15 %: 0,15 g de p-Nitrofenilortofosfato-disódico se disolvieron en la solución tampón de Carbonato-bicarbonato de sodio y se aforó a 100 mL.
- Solución alcalina MA 01 Alcalino, 5 % (pH 11,5).
- Soluciones de calibración del pH-metro: solución tampón pH 7,00, METTLER TOLEDO y solución tampón pH 4,01, METTLER TOLEDO.
- Solución madre azul de metileno: se disolvió aproximadamente 0,012 g de azul de metileno en etanol al 96 % hasta saturación.
- Solución de trabajo azul de metileno: 5 mL de solución madre se diluyeron a 200 mL con agua destilada.
- NaOH 30 %: Se disolvieron 90 g de NaOH comercial en 300 mL de agua destilada.
- Ácido Bórico al 4 %: 40 g de H_3BO_3 comercial se disolvieron en un litro de agua destilada; para ello fue necesario calentar la solución en una plancha a 30 °C.
- Ácido clorhídrico 0,1 N: se diluyeron 2 mL de HCl al 37 % en agua destilada y se aforó a 250 mL.
- Hidróxido de sodio 0,1 N: se disolvieron 1,02 g de NaOH al 98 % en agua destilada y se aforó a 250 mL.
- Fenolftaleína al 1 %: se disolvió 1,0000 g de fenolftaleína CARLO ERBA en 100 mL de etanol.

- Hidróxido de potasio 0,06 M: se disolvieron en agua destilada 0,342 g de KOH al 98 % y se aforó a 100 mL.
- Solución de dicromato de potasio de 50 ppm: se pesaron 0,0051 g de $K_2Cr_2O_7$ al 98 %, previamente seco a 110 °C durante dos horas; se disolvieron en la solución de KOH 0,06 M hasta completar un volumen de 100 mL.
- Soluciones de dicromato de potasio de 4, 8, 16, 24 y 32 ppm: se diluyeron respectivamente, volúmenes de 2, 4, 8, 12 y 16 mL de la solución de $K_2Cr_2O_7$ de 50 ppm y se aforaron a un volumen de 25 mL.
- Solución patrón de lactulosa de 1,0 mg/mL: se pesaron 0,0105 g de lactulosa y se disolvieron con ayuda de una plancha de agitación, en metanol frío hasta completar un volumen de 10 mL.
- Soluciones patrón de lactulosa de 0,07, 0,1, 0,3, 0,5 y 0,7 mg/mL: se diluyeron respectivamente, volúmenes de 0,35, 0,5, 1,5, 2,5 y 3,5 mL de la solución de lactulosa de 1,0 mg/mL en metanol frío, hasta completar en todos los casos un volumen de 5,0 mL.

4.2 CONDICIONES ASÉPTICAS DEL MATERIAL DE MUESTREO

Considerando que la higiene constituye un factor esencial para la calidad de la leche durante su procesamiento y análisis, debe garantizarse el uso de instrumentos limpios y desinfectados que no afecten o alteren la flora normal que contiene, aportando carga microbiana adicional.

4.2.1 Limpieza y secado del material: el material de vidrio se dejó de un día para otro en mezcla sulfocrómica, se enjuagó con abundante agua y se lavó con una solución alcalina MA 01 Alcalino al 5 % (pH 11,5); esta solución se eliminó con abundante agua de la llave, luego se enjuagó tres veces con agua caliente y finalmente con agua destilada. Los recipientes de vidrio no aforados se secaron en estufa durante dos horas a 100 °C.

Los recipientes plásticos empleados para la recolección de las muestras se lavaron con la solución alcalina MA 01 Alcalino al 5 % (pH 11,5); esta solución se eliminó con abundante agua de la llave, luego se enjuagó tres veces con agua caliente y finalmente con agua destilada; los recipientes se dejaron escurriendo boca abajo sobre una superficie limpia hasta sequedad.

4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Teniendo en cuenta que el análisis físico-químico aporta un diagnóstico preliminar sobre la calidad de la leche, el muestreo se realizó bajo las condiciones y requisitos establecidos en las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, INVIMA³.

Las muestras utilizadas para la intercalibración se recolectaron en horas de la mañana en una industria láctea, donde también se analizaron las muestras; para su recolección, se utilizaron recipientes de plástico de 5 L de capacidad, de boca ancha y cierre hermético, y se transportaron al laboratorio de la Unidad de Análisis Industriales, en una nevera de material isotérmico a una temperatura inferior a 10 °C. Las muestras recogidas para la intercalibración, fueron muestras homogéneas a partir de leche entera pasteurizada y ultrapasteurizada, tomadas directamente de los tanques de homogenización; y muestras de leche entera cruda tomadas directamente de las cantinas provenientes de los proveedores de la empresa. El volumen de muestra tomado fue de dos litros, para cada uno de ellas.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron envasadas en viales de vidrio de 250 mL, registradas, rotuladas* y rápidamente refrigeradas a 4 °C para realizar dentro de las 24 horas siguientes al muestreo, las determinaciones de pH, acidez,

• Las muestras se codificaron para evitar algún tipo de implicación que pudiera suscitarse por parte de las empresas lácteas

densidad, grasa, prueba de reducción del azul de metileno y fosfatasa; las determinaciones de proteína y ceniza, se realizaron dentro de las 48 horas siguientes al muestreo.

Antes de cada análisis, las muestras se homogenizaron agitándolas manualmente mediante inversión lenta y constante del vial de vidrio que las contenía.

Adicionalmente, se seleccionaron gran variedad de leches líquidas destinadas al análisis de lactulosa, directamente de los supermercados de la ciudad de Popayán, durante todo el mes de junio de 2006. La selección se hizo al azar, y se trató de cubrir toda la variedad de leches existentes y exhibidas al consumidor por parte de las diferentes industrias lácteas, así como aquellas que tuvieran una fecha de vencimiento prolongada, alrededor de tres a seis meses.

Para ello, se seleccionaron 21 tipos de leche ultrapasteurizada (UHT) en envase Tetra Pak (cada una de ellas, se halla descrita en el Anexo I), dentro de las que se encuentran:

Leches con diferente contenido de grasa: enteras, semidescremadas y descremadas.

Leches adicionadas de vitaminas, minerales y fibra.

Leches deslactosadas.

Una vez adquiridas, se trasladaron al laboratorio, donde se envasaron, registraron, rotularon y refrigeraron siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras de la intercalibración. Adicionalmente, se congeló inmediatamente una cantidad de cada leche del mercado, la cual se destinó para la determinación y cuantificación de lactulosa.

4.4 OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS Y ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LECHES LÍQUIDAS

Se realizó un análisis microbiológico, que incluyó examinar la actividad enzimática por medio de la prueba de fosfatasa y la actividad reductora de bacterias, a través de la prueba de tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) en las muestras de leche líquida; para optimizar las condiciones experimentales de cada una de las pruebas, se realizaron diez lecturas que permitieron obtener parámetros de confiabilidad para los resultados obtenidos de las metodologías empleadas. Estas pruebas se realizaron inmediatamente a la llegada de las muestras al laboratorio, debido a la susceptibilidad de la leche al deterioro por microorganismos.

De igual manera y con el fin de establecer el nivel de confianza apropiado de la metodología implementada y empleada en el laboratorio de la UAI, para llevar a cabo los análisis físico-químicos que permiten realizar un diagnóstico preliminar de la calidad de la leche, se realizó un ejercicio de intercalibración con el laboratorio de una industria láctea de la ciudad de Popayán, que suministró las muestras.

Los análisis físico-químicos establecidos como requisito para control de calidad de la leche, por las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, INVIMA³, incluyen la determinación de acidez, densidad, contenido de materia grasa y extracto seco total y desengrasado.

Estos análisis físicos y químicos, están basados en los métodos oficiales de análisis de la AOAC INTERNATIONAL³⁴ (incluyendo otros que pudiesen aportar a la caracterización de la composición de la leche) y se realizaron para cada muestra de leche líquida empleada en la intercalibración. Análisis como pH, densidad, acidez y materia grasa, se realizaron inmediatamente a la llegada de las muestras al laboratorio, debido a que la leche es una matriz lábil; para cada

análisis físico-químico incluidos porcentaje de proteína y cenizas realizados durante las 48 horas siguientes, se realizaron diez lecturas, que permitieron determinar parámetros de confiabilidad de las metodologías empleadas.

Una vez optimizadas y estandarizadas las respectivas metodologías para el análisis microbiológico y la caracterización físico-química de leches líquidas, se aplicaron a las muestras del supermercado, destinadas al análisis de lactulosa; cada determinación físico-química se realizó por triplicado.

A continuación, se detallan uno a uno los métodos empleados para los análisis microbiológicos y físico-químicos anteriormente mencionados.

Análisis microbiológicos:

4.4.1 Prueba de reducción del azul de metileno (TRAM): en un tubo de ensayo de 20 mL de capacidad, se adicionaron volumétricamente 10 mL de leche, cuidando de no mojar las paredes del tubo; se agregó volumétricamente con pipeta, 1 mL de la solución de trabajo de azul de metileno y se agitó constantemente para conseguir homogeneidad completa del color azul formado. El tubo se tapó con un algodón y se mantuvo en un baño maría a una temperatura de 37°-38 °C, cuidando que el nivel del agua del baño cubriera el nivel de la mezcla de leche y azul de metileno, para mantener uniformidad en la temperatura.

Se monitoreó el tiempo necesario para la decoloración, la cual ocurre cuando todo el contenido del tubo se ha decolorado completamente ó al menos 5 mm desde la superficie.

Como criterio de comparación, se adicionó a un tubo similar, 40 mL de la muestra de leche y 1 mL de agua corriente (que previamente se sumergió en agua hirviendo durante 5 minutos antes de realizarle el mismo procedimiento que a la

muestra). La interpretación de la prueba se realizó con base a la escala de clasificación (*Sección 2.4.1 pág. 30*).

4.4.2 Prueba de fosfatasa: a dos tubos de ensayo de 10 mL de capacidad, se adicionaron volumétricamente 5 mL de la solución transparente de p-nitrofenilortofosfato disódico al 0,15 %, se taparon y se colocaron en un baño maría a 37 °C durante 5 minutos; después de este tiempo, al primer tubo se le adicionó 1 mL de la muestra de leche y al segundo 1 mL de leche cruda para tomarlo como referencia. Inmediatamente, se incubaron en un baño maría durante dos horas a 37 °C. Si hay desarrollo de un color amarillo, hay presencia de la enzima.

Análisis físico-químicos:

4.4.3 Determinación de la densidad: en una probeta de 250 mL (en posición inclinada para evitar la formación de espuma e incorporación de aire), se vertieron suavemente 200 mL de leche homogenizada a una temperatura de 15 °C ($\pm 1,0$ °C); una vez alcanzada esta temperatura, se introdujo un lactodensímetro por todo el centro del líquido, haciendo una leve rotación para evitar que se pegara a las paredes. Cuando el lactodensímetro se estabilizó, se leyó la densidad, cuidando que la superficie de la leche enrasara con el grado lactodensímetro de la escala correspondiente al tipo de muestra que se esté analizando (existe una escala para leche con crema y otra para leche sin crema). Se anotó la lectura de densidad y se registró la temperatura que indicó el termómetro de la parte superior del vástago para realizar la posterior corrección, como se indica a continuación:

- Si la lectura de temperatura es mayor a la temperatura de referencia, la corrección se realizó sumando 0,2 a los grados lactodensímetros leídos por cada grado centígrado por encima de la temperatura de referencia; así:

Grados lactodensímetros corregidos = grados leídos + 0,2(T °C leída – 15 °C) (Ecuación 1)

- Si la lectura de temperatura, es inferior a la temperatura de referencia, la corrección se realizó restando 0,2 a los grados lactodensímetros leídos por cada grado centígrado por debajo de la temperatura de referencia, así:

Grados lactodensímetros corregidos = grados leídos – 0,2(15 °C- T °C leída) (Ecuación 2)

4.4.4 Determinación de acidez: para ello se midió volumétricamente 10 mL de leche en cada uno de los erlenmeyer de 100 mL y se añadió volumétricamente 2 mL de solución de fenolftaleína al 1 % a cada recipiente. El contenido de estos erlenmeyer se tituló con una solución estándar de NaOH 0,1 N contenida en una microbureta de 10 mL, hasta la aparición de un color rosa débil que permaneció durante 1 minuto. Nota: la titulación no debe emplear más de 20 segundos.

El valor de acidez, expresado como porcentaje (p/v) de ácido láctico, se calculó según la ecuación 3.

$$\% \text{Acidez} = \frac{V_x N_x F}{V_m} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde,

V = Volumen de NaOH gastado en la titulación

N = Normalidad del NaOH

F = Factor de conversión a ácido láctico: (1 equivalente g NaOH \equiv 1 equivalente g ácido láctico) x 90g ácido láctico

V_m = Volumen de muestra titulado

4.4.5 Determinación de pH: la medida de pH se realizó a temperatura ambiente, con la ayuda de un pH-metro METTLER TOLEDO 8603, previamente calibrado.

4.4.6 Determinación del contenido de grasa: se midieron volumétricamente 10 mL de H₂SO₄ para Gerber y se introdujeron en los butirómetros de escala 0-8 %, evitando mojar las paredes; seguidamente, se agregaron por la pared del butirómetro, volumétricamente 11 mL de leche, cuidando que no se mezclara con el ácido. Inmediatamente, se adicionó 1 mL de alcohol amílico.

Se tapó el butirómetro con su tapón correspondiente y se agitó de forma efectiva envolviéndolo en un paño para evitar quemaduras debidas a la fuerte reacción exotérmica producida.

Se colocó el butirómetro en un baño maría a 65-70 °C por 15 minutos con el tapón hacia abajo; se centrifugó por 10 minutos a 1380 rpm, y nuevamente se llevó al baño maría por 5 min. más, hasta que la separación de la grasa fue nítida. En ese momento se leyó el espesor de la capa grasa acumulada en la parte superior calibrada del butirómetro.

4.4.7 Determinación de extracto seco (ES): la determinación del extracto seco se basó en los valores de densidad y porcentaje de materia grasa, usando la fórmula de Richmond³ (ecuación 4).

$$\%ES = 250(\rho - 1) + 0,2(\%G) + 0,14 + \%G \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde,

ES = Extracto seco

ρ = Densidad de la leche a 15°C

%G = Porcentaje de materia grasa

4.4.8 Determinación del extracto seco desengrasado (ESD): para calcular el extracto seco desengrasado, se tuvieron en cuenta los valores de densidad y porcentaje de materia grasa según la fórmula de Richmond³ (ecuación 5).

$$\%ESD = 250(\rho - 1) + 0,2(\%G) + 0,14 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde,

ESD = Extracto seco desengrasado

ρ = Densidad de la leche a 15°C

%G = Porcentaje de materia grasa

4.4.9 Determinación de proteína: se vertió volumétricamente 1 mL de leche al tubo de digestión kjeldahl y se le agregó 1 g de catalizador (K_2SO_4 - $CuSO_4$ - TiO_2) y 9 mL de H_2SO_4 concentrado. Se instaló el tubo en el equipo de digestión y se graduó el calentamiento suavemente durante 1 hora, hasta que dejó de formar espuma. Se continuó la digestión hasta que la muestra quedó completamente clara y libre de materia orgánica, durante aproximadamente tres horas a 370 °C (regulador de energía en posición 10); completada la digestión, se apagó la estufa y se aislaron los tubos para dejarlos enfriar a temperatura ambiente; ya fríos los tubos, se les adicionaron unas gotas de fenolftaleína (coloración naranja) y se instalaron en el destilador BÜCHI donde se les adicionó directamente 50 mL álcali al 30 % en exceso (hasta coloración azul tenue que se obtiene al finalizar la reacción) para liberar el amoníaco, el cual se destiló por arrastre de vapor y se recogió en un erlenmeyer de 250 mL que contenía H_3BO_3 al 4 % con una solución indicadora de tashiro que dió una coloración violeta; después del cambio a color verde en el contenido del erlenmeyer o hasta obtener el doble del volumen inicial, se destiló durante cinco minutos más.

Finalmente, se tituló el borato de amonio contenido en el erlenmeyer con HCl 0,1 N, hasta obtener nuevamente una coloración violeta.

Paralelamente se montó un blanco (catalizador y H_2SO_4 concentrado) en las mismas proporciones y bajo las mismas condiciones del procedimiento anterior. El

contenido de nitrógeno y proteína se determinó de acuerdo con las ecuaciones 6 y 7.

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{V \times N \times F}{g} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$\% \text{proteína} = \% \text{nitrógeno} \times 6,38 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde,

V = Volumen de HCl gastado en la titulación

N = Normalidad del ácido

F = Factor de conversión a gramos de nitrógeno (1 equivalente g HCl \equiv 1 equivalente g N₂) x 14 g N

4.4.10 Determinación de cenizas: en el horno de secado a 100 °C por 30 minutos, se secó un crisol de porcelana con tapa (previamente lavado con mezcla sulfocrómica, agua corriente y agua destilada) y, posteriormente se enfrió dentro de un desecador y se registró su peso; seguidamente se pesó dentro de él con precisión $\pm 1,0000$ g de muestra de leche, y se colocó el crisol sin tapa en el horno á 60 °C hasta sequedad, aproximadamente una hora. El crisol tapado, se colocó en el horno de calcinación y se aumentó progresivamente la temperatura durante 30 minutos sin exceder los 425 °C, con el fin de lograr la incineración y liberación de los compuestos gaseosos, sin formación de llamas; posteriormente, se aumentó gradualmente la temperatura hasta llegar a los 550 °C y se mantuvo constante durante 2 horas hasta obtener unas cenizas blancas ó grisáceas. Completado el tiempo de calcinación, se bajó la temperatura del horno a unos 100 °C aproximadamente, para sacar cuidadosamente los crisoles y llevarlos al desecador para su enfriamiento y pesado. El contenido de cenizas se determinó según la ecuación 8.

$$\%Cenizas = \frac{Wc}{Wm} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde,

Wc = Peso de las cenizas

Wm = Peso en gramos de leche

4.4.11 Análisis estadístico: los datos obtenidos para cada parámetro analizado con un ejercicio de intercalibración (densidad, acidez, pH, grasa, ES y ESD), se sometieron a un análisis estadístico en el paquete SPSS, aplicando la prueba T para el análisis de significancia con diferencia entre medias, obtenidas experimentalmente en cada laboratorio.

4.5 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTULOSA

La determinación y cuantificación de lactulosa en las muestras de leche, se llevó a cabo utilizando la técnica de espectrofotometría UV-Visible. Para ello, se contó con dos equipos (Figuras 8 y 9), en los cuales se realizaron las mediciones con el fin de comparar sus sensibilidades; la cuantificación se realizó en la región visible, debido a la formación de un compuesto coloreado.



Figura 8. Espectrofotómetro UV-visible, THERMO GENESYS 6



Figura 9. Espectrofotómetro UV-visible, INTRALAB-DMS 100

4.5.1 Calibración de los espectrofotómetros: para la calibración de los espectrofotómetros, se preparó una solución estándar de dicromato de potasio 0,06 M; a partir de esta solución, se prepararon soluciones de dicromato de potasio de 4, 8, 16, 24 y 32 ppm y se midió su absorbancia, a una longitud de onda de 373 nm, empleando como blanco KOH 0,06 M. Adicionalmente, para el equipo INTRALAB DMS-100, se realizó un barrido desde una longitud de onda de 275 a 750 nm con la celda de óxido de holmio.

La calibración de los espectrofotómetros se realizó mensualmente y cada vez que se realizaron lecturas de muestras o de patrones; se incluyeron por lo menos dos estándares de concentración conocida para revisar el funcionamiento de los equipos.

4.5.2 Selección de la longitud de onda: con el fin de conocer la longitud de onda de máxima absorción para establecer las condiciones óptimas de trabajo y poder preparar una curva de calibración que relacionara la absorbancia del analito con su concentración, se realizó un barrido en la región visible, comprendida en el intervalo de longitudes de onda de 380 a 800 nm³⁸. El barrido se realizó con soluciones de diferentes concentraciones patrón de lactulosa (3 y 15 mg/mL).

De igual manera, se empleó un detallado tratamiento matemático, basado en las reglas de Woodward – Fieser⁴³, para determinar la longitud de onda teórica de

acuerdo con la estructura electrónica de la molécula absorbente formada. Esta molécula es separada en un sistema base de absorción con un valor de λ teórico, el cual se va incrementando en determinados valores, de acuerdo con la posición de los sustituyentes.

4.5.3 Método de cuantificación: el método empleado para el análisis cuantitativo de lactulosa, fue la curva de calibración y para ello se prepararon una serie de soluciones patrón con concentraciones de 0,07, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 a 1,0 mg/mL. Con las absorbancias registradas para cada concentración, se construyó la curva patrón; luego, se registraron las absorbancias de las muestras y con el valor promedio, en la curva de calibración, se determinaron las concentraciones correspondientes.

4.6 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTULOSA

Una vez seleccionada la longitud de onda en la cual se realizó la cuantificación de lactulosa, se procedió a optimizar los parámetros estadísticos que establecerán la confiabilidad de los resultados. A continuación, se describen los pasos seguidos para la determinación de dichos parámetros.

4.6.1 Linealidad: para evaluar la linealidad, se preparó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 0,07, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 a 1,0 mg/mL de lactulosa. Las soluciones se prepararon previamente al análisis y se mantuvieron almacenadas a 4 °C; sin embargo, una vez preparadas, inmediatamente se inició con el proceso para ser medidas. A cada solución patrón de lactulosa se le realizaron cinco lecturas y a partir de los datos obtenidos de absorbancia y sus respectivas concentraciones, se trazaron las curvas de calibración en cada equipo.

4.6.2 Precisión: la precisión se estableció en condiciones de repetibilidad, y su evaluación correspondió tanto al sistema como al método, es decir, desde la toma y preparación de la muestra hasta la medición de la lactulosa. Esta dispersión de medidas respecto a un valor medio, se expresó en términos de la desviación estándar relativa (DSR).

4.6.2.1 Repetibilidad del método: fue determinada realizando diez lecturas de alícuotas de una muestra de leche ApSCaV y de dos soluciones patrón de lactulosa (0,1 y 0,3 mg/mL), en diferentes días (10 días consecutivos). El análisis en cada día incluye desde la preparación hasta la medición de la muestra y/o solución patrón.

4.6.2.2 Repetibilidad ó precisión espectrofotométrica: para evaluar la repetibilidad ó precisión espectrofotométrica, se realizaron cinco lecturas repetidas (N=5) de la absorbancia de los patrones (0,1 y 0,3 mg/mL) y de la muestra de leche ApSCaV. Esta determinación se realizó en diferentes días (10 días consecutivos), para la misma muestra.

4.6.3 Sensibilidad: los parámetros empleados para determinar la sensibilidad fueron los límites de detección y cuantificación, para los cuales se prepararon tres soluciones estándar de las concentraciones más bajas (0,07, 0,1 y 0,3 mg/mL), las cuales se midieron diez veces, al igual que un blanco, y se analizó la relación señal/ruido.

4.6.4 Exactitud del método: para conocer la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia (curva de calibración), se evaluó la exactitud en términos del porcentaje de recuperación de la lactulosa. Para ello, se empleó una muestra de leche (PS) y una solución patrón de baja concentración 0,1 mg/mL, a las cuales se les agregó cierta cantidad conocida de una solución patrón de

lactulosa de mayor concentración (1,0 mg/mL). A cada uno se le midió cinco veces el valor de su absorbancia y se le halló el porcentaje de recuperación.

4.7 ESTABILIDAD DE LA LACTULOSA

Para evaluar la estabilidad de patrones y muestras en el tiempo, se prepararon tres soluciones estándar de diferente concentración (0,07, 0,1 y 0,3 mg/mL) y una muestra de leche (ApSCaV), las cuales fueron preparadas, analizadas y guardadas (en viales de vidrio tapa rosca, selladas herméticamente y almacenadas a 4 °C) para leerlas nuevamente durante diez días consecutivos.

4.8 EXTRACCIÓN DE LACTULOSA Y OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ABSORBENTE

Para obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio de la UAI, resultados confiables para la determinación de lactulosa, se optimizaron las condiciones experimentales del método analítico. Para ello, se inició con un preacondicionamiento de las muestras de leche, el cual consistió en dejar atemperar (dejar en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente) los viales de vidrio que contenían las muestras y que se encontraban en el congelador; una vez descongeladas y a temperatura ambiente, se procedió a la extracción del carbohidrato.

4.8.1 Extracción de lactulosa: para extraer la lactulosa de las muestras de leche, se tomó 1 mL de la muestra con pipeta volumétrica y se aforó a 10 mL con metanol³⁷, como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Extracción de lactulosa en metanol

A continuación, la disolución se transvasó rápidamente a un tubo de ensayo como se muestra en la figura 11, se agitó en un vortex durante 1 minuto y se dejó en reposo en la nevera hasta el día siguiente para evitar la volatilización del metanol y precipitar la proteína.



Figura 11. Precipitación de la fracción proteínica

4.8.2. Formación del complejo coloreado: para formar la especie que absorbió en la región visible, se empleó un método cetoespecífico modificado³³ propuesto previamente para la determinación de lactulosa en mezclas de lactosa-lactulosa³³.

Este método se basa en el uso del reactivo antrona-ácido acético-ácido fosfórico-etanol, cuya preparación se describe en la sección 4.1.3.1.

El procedimiento se comenzó tomando una alícuota de 0,2 mL del sobrenadante obtenido en la precipitación de proteínas con metanol (Sección 4.8.1) en el cual se encuentra soluble la lactulosa. En el diagrama 2, se indican los pasos a seguir para la formación de la especie absorbente.

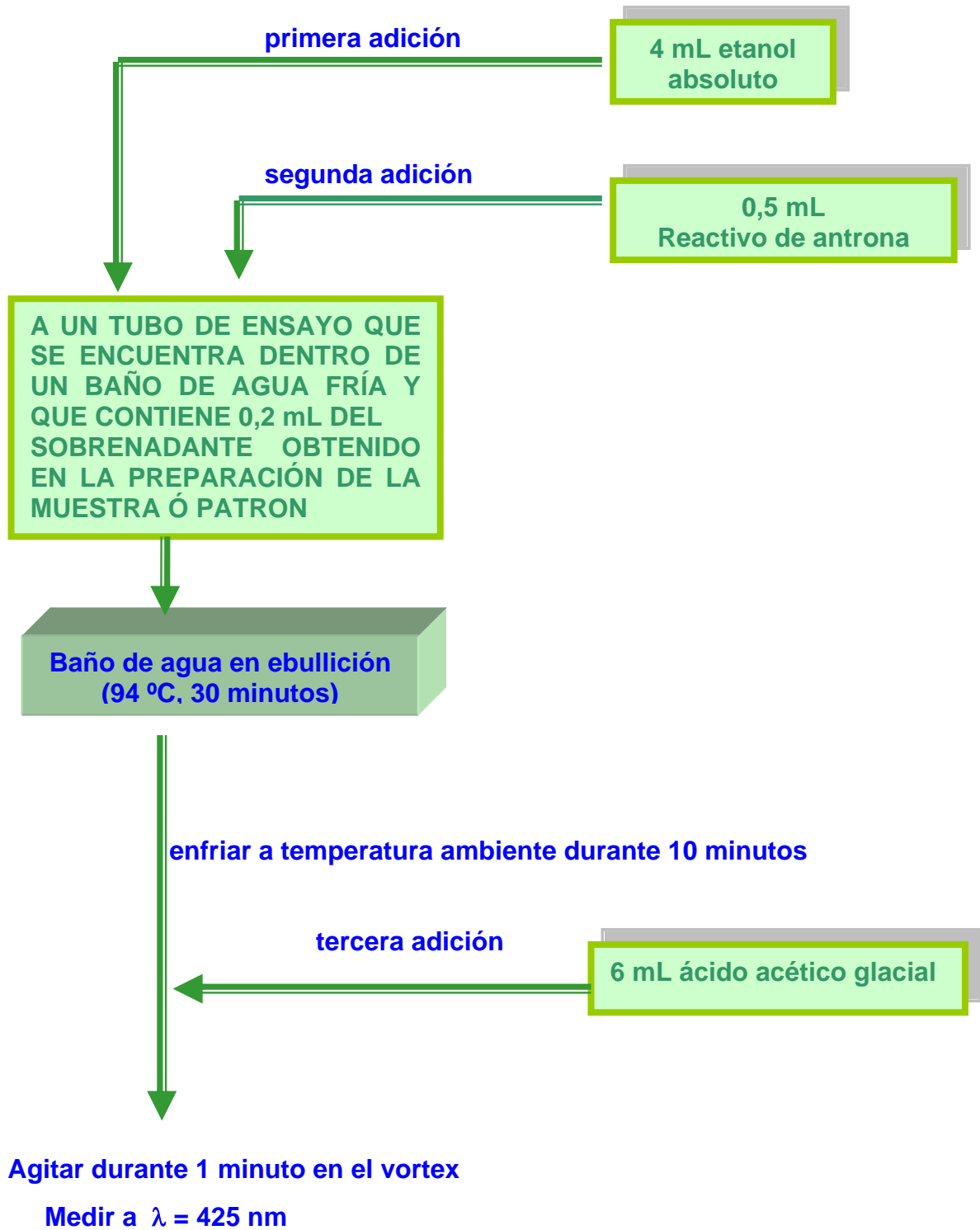


Diagrama 2. Metodología espectrofotométrica

4.9 APLICACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTULOSA EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIALES

Puesto a punto el método analítico, para estimar la concentración de lactulosa en las muestras de leche comerciales que se analizaron, se emplearon las ecuaciones de las rectas obtenidas para cada equipo (sección 4.6.1), en las cuales se despejó el valor de la concentración, reemplazando el promedio de la absorbancia obtenida. A esta concentración se le aplicó un factor de dilución (ecuación 9), para obtener la concentración real en cada una de las muestras de leche analizadas.

$$X \frac{mg}{mL} \times \left(\frac{10,0mL}{1,0mL} \right) \quad \text{(Ecuación 9)}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS Y ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LECHE LÍQUIDA

A continuación, se muestran los resultados de la optimización y la estandarización de los análisis microbiológicos y físico-químicos que se llevaron a cabo en la UAI-sección alimentos, utilizando tres muestras de leche entera cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada, provenientes de una industria láctea junto a la cual se realizó un ejercicio de intercalibración por medio de su laboratorio, para estandarizar los análisis físico-químicos. En la intercalibración, no se incluyeron los análisis microbiológicos.

5.1.1 Optimización de pruebas microbiológicas: la optimización de la metodología que permitió evaluar la carga microbiana, así como la presencia de enzimas que alteran la matriz, arrojó los resultados que se indican en la tabla 8.

Tabla 8. Pruebas microbiológicas para evaluar la calidad de la leche

LECHE ENTERA	TRAM	FOSFATASA
CRUDA	4 horas	Positiva*
PASTEURIZADA	7 horas	Negativa**
ULTRAPASTEURIZADA	7 horas	Negativa

* Presencia de fosfatasa

** Ausencia de fosfatasa

En las diez lecturas realizadas en las dos pruebas para cada muestra de leche, se obtuvieron valores acordes a los establecidos por la norma³.

De los resultados, puede observarse que la flora normal de la leche cruda y de las leches higienizadas no ha sido alterada durante la manipulación y que por tanto se han mantenido condiciones asépticas para tratarlas, puesto que no hubo cambio de color del indicador azul de metileno, lo cual corrobora la ausencia de bacterias reductoras; estos resultados muestran, que el grado de pasteurización aplicado a las leches higienizadas fue el adecuado.

Respecto a la prueba de fosfatasa, el resultado fue negativo para las leches higienizadas, indicando nuevamente un óptimo tratamiento de pasteurización, mientras que para la leche cruda, la prueba resultó positiva como era de esperarse, ya que la enzima permanece activa mientras la leche no sea sometida a un proceso de pasteurización, en el cual se destruye.

5.1.2 Estandarización de análisis físico-químicos: con el fin de implementar las técnicas analíticas y de confirmar la confiabilidad de los resultados obtenidos para los análisis físico-químicos, se determinaron parámetros de confianza como precisión y exactitud.

5.1.2.1 Precisión: para determinar la precisión del método se realizaron de cinco a diez repeticiones de cada una de las metodologías de densidad, acidez, pH, grasa, proteína y cenizas.

Para evaluar la dispersión de las medidas respecto a su valor medio, se calculó la desviación estándar (s) y se estableció un intervalo de confianza (μ) de la medida con una probabilidad del 90% y de igual manera, se calculó la desviación estándar relativa (DSR), como se indica en las tablas 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

Tabla 9. Medidas de densidad de la leche en g/mL a 15 °C

LECHE ENTERA	CRUDA	PASTEURIZADA	UHT
1	1,0310	1,0310	1,0300
2	1,0310	1,0310	1,0310
3	1,0310	1,0320	1,0310
4	1,0310	1,0320	1,0310
5	1,0310	1,0320	1,0310
6	1,0310	1,0310	1,0310
7	1,0310	1,0310	1,0310
8	1,0310	1,0320	1,0310
9	1,0310	1,0320	1,0310
10	1,0310	1,0320	1,0310
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	1.0310 ± 0,0001	1,0320 ± 0,0003	1.0310 ± 0,0001
s	0,0002	0,0006	0,0002
DSR (%)	0,019	0,058	0,019

Tabla 10. Medidas del porcentaje de acidez

LECHE ENTERA	CRUDA	PASTEURIZADA	UHT
1	0,130	0,168	0,134
2	0,134	0,178	0,134
3	0,134	0,176	0,131
4	0,134	0,178	0,134
5	0,134	0,179	0,134
6	0,130	0,178	0,134
7	0,134	0,178	0,131
8	0,134	0,174	0,131
9	0,130	0,179	0,134
10	0,134	0,168	0,134
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	0,133 ± 0,001	0,176 ± 0,002	0,133 ± 0,001
s	0,002	0,004	0,001
DSR (%)	1,50	2,27	0,75

Tabla 11. Medidas de pH de la leche

LECHE ENTERA	CRUDA	PASTEURIZADA	UHT
1	6,693	6,573	6,779
2	6,692	6,592	6,779
3	6,690	6,595	6,784
4	6,696	6,593	6,780
5	6,699	6,599	6,777
6	6,698	6,600	6,779
7	6,701	6,603	6,781
8	6,699	6,599	6,781
9	6,703	6,597	6,778
10	6,696	6,599	6,795
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	6,697 ± 0,002	6,597 ± 0,002	6,780 ± 0,001
s	0,004	0,004	0,002
DSR (%)	0,06	0,06	0,03

Tabla 12. Medidas del porcentaje de grasa

LECHE ENTERA	CRUDA	PASTEURIZADA	UHT
1	3,80	3,00	3,30
2	3,80	3,10	3,20
3	3,80	3,00	3,20
4	3,70	3,00	3,30
5	3,80	2,90	3,20
6	3,70	2,90	3,90
7	3,60	3,10	3,20
8	3,70	3,10	3,20
9	3,70	3,10	3,20
10	3,70	3,00	3,20
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	3,73 ± 0,03	3,02 ± 0,04	3,29 ± 0,12
s	0,06	0,07	0,21
DSR (%)	1,60	2,71	6,38

Tabla 13. Medidas del porcentaje de proteína

LECHE ENTERA	CRUDA	PASTEURIZADA	UHT
1	2,17	2,86	2,71
2	2,17	2,84	2,71
3	2,15	2,86	2,71
4	2,17	2,84	2,71
5	2,17	2,81	2,66
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	2,16 ± 0,01	2,84 ± 0,01	2,70 ± 0,01
s	0,01	0,02	0,02
DSR (%)	0,46	0,70	0,74

Tabla 14. Medidas del porcentaje de cenizas

LECHE ENTERA	CRUDA	PASTEURIZADA	UHT
1	0,68	0,72	0,72
2	0,69	0,72	0,72
3	0,69	0,71	0,72
4	0,70	0,70	0,72
5	0,69	0,70	0,72
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	0,69 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,72 ± 0,01
s	0,01	0,01	0,01
DSR (%)	1,40	1,40	1,38

Una vez, aplicado el criterio Q para rechazar datos, se obtuvieron bajos valores de DSR, inferiores al 6,38 % y dentro del rango apropiado y aceptado (5 y 10 % ó mayores, trabajando en un intervalo de aceptación del 97–103 %) de RSD para matrices complejas como fluidos biológicos (entre los que se encuentra la leche) y análisis de trazas³⁵. Estos valores bajos obtenidos experimentalmente, confirman la buena repetitividad de los métodos empleados para cada ensayo.

La evaluación de la precisión, permitió obtener los valores medios de cada parámetro físico-químico, encontrándose que la densidad, acidez, pH, grasa, proteína y cenizas para leche entera cruda e higienizada, esta dentro del rango de 1,031-1,032 g/mL, 0,133-0,176%, 6,597-6,780, 3,02-3,73, 2,16-2,84 y 0,69-0,72 respectivamente; lo cual indica, que los tres tipos de leche analizados cumplen con los parámetros establecidos y aceptados teóricamente por el Ministerio de Salud para la composición química de la misma.

5.1.2.2 Intercalibración: la precisión también se evaluó en condiciones reproducibles, realizando un ejercicio de intercalibración con el laboratorio (Laboratorio de referencia) de una industria láctea, que proporcionó las muestras de leche a la UAI; durante la intercalibración, las muestras se analizaron el mismo día de su recolección, de tal forma que pudiera establecerse un nivel de confianza de la metodología empleada en la UAI para la determinación de densidad, acidez, pH, grasa, ES y ESD. Los resultados de la intercalibración se indican en la tabla

15; es importante aclarar que el laboratorio de referencia suministró los valores promedio, por lo cual no se tienen datos para las desviaciones estándar y estándar relativa.

Tabla 15. Resultados de la intercalibración de los análisis físico-químicos

ANÁLISIS	LECHE ENTERA	LAB. UAI $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ DSR (%)	LAB. REF
ρ (g/mL)	CRUDA	(1.0310 ± 0,0001), 0,019	1,0300
	PASTEURIZADA	(1,0320 ± 0,0003), 0,058	1,0305
	UHT	(1.0310 ± 0,0001), 0,019	1,0310
Acidez (%)	CRUDA	(0,133 ± 0,001), 1,50	0,138
	PASTEURIZADA	(0,176 ± 0,002), 2,27	0,154
	UHT	(0,133 ± 0,001), 0,75	0,136
pH	CRUDA	(6,697 ± 0,002), 0,06	6,630
	PASTEURIZADA	(6,597 ± 0,002), 0,06	6,600
	UHT	(6,780 ± 0,001), 0,03	6,760
G (%)	CRUDA	(3,73 ± 0,03), 1,60	3,70
	PASTEURIZADA	(3,02 ± 0,04), 2,71	3,20
	UHT	(3,29 ± 0,12), 6,38	3,30
ES (%)	CRUDA	(12,36 ± 0,08), 0,64	12,08
	PASTEURIZADA	(11,66 ± 0,15), 1,2	11,61
	UHT	(11,81 ± 0,27), 2,2	11,85
ESD (%)	CRUDA	(8,63 ± 0,13), 1,5	8,38
	PASTEURIZADA	(8,65 ± 0,12), 1,3	8,41
	UHT	(8,52 ± 0,08), 0,93	8,55

De la determinación de proteína y cenizas no se obtuvieron datos de intercalibración, ya que el laboratorio de referencia no realiza estos análisis como rutina; por otra parte, la determinación del porcentaje de extracto seco (ES) y extracto seco desengrasado (ESD), fue evaluado por la fórmula de Richmond con

los valores promedio de grasa y densidad, como se indica en las secciones 4.4.7 y 4.4.8 respectivamente.

La similitud alcanzada entre los resultados obtenidos con el ejercicio de intercalibración, permite hacerse una idea sobre el grado de concordancia que existe entre las medidas obtenidas con los métodos implementados en la UAI y que comúnmente son empleados por la industria láctea; sin embargo, no proporcionan la confiabilidad requerida para afirmar la reproducibilidad entre ellos cuando son aplicados a una misma muestra en condiciones diferentes de trabajo, de instrumentos, de analistas y de laboratorios. Por lo tanto, es importante evaluar la diferencia significativa que existe entre estos datos, mediante un análisis de significancia entre valores medios.

5.1.2.3 Análisis estadístico: el análisis estadístico realizado con la prueba T para comparación de una media experimental con un valor conocido, en el ejercicio de intercalibración entre laboratorios, reportó para la leche entera cruda diferencia significativa en parámetros como densidad ($t= 15,810$), acidez ($t= 7,905$), pH ($t= 52,964$), ES ($t= 12,648$) y ESD ($t= 6,588$); para la leche entera pasteurizada, la diferencia significativa se presentó en la densidad ($t= 7,905$), acidez ($t= 17,391$), pH ($t= 2,371$), grasa ($t= 8,131$) y ESD ($t= 6,899$); contrario al caso de la leche entera UHT donde solo hubo diferencia significativa para la acidez ($t= 9,486$) y el pH ($t= 31,62$). El análisis estadístico detallado se indica en el Anexo II.

Posiblemente, esta diferencia es debida a que son análisis muy dependientes del carácter lábil de la leche, el cual pudo afectarse bajo las condiciones de muestreo, incluido el tiempo transcurrido para transporte de muestras y por consiguiente; la reproducibilidad en los resultados se vio alterada. Por otra parte, los valores tomados como conocidos (LAB. REF), no son valores certificados, restándole confiabilidad al análisis.

5.1.2.4 Exactitud: se estableció la exactitud del método, realizando la comparación entre los datos obtenidos experimentalmente tanto en la UAI como en el laboratorio de referencia, con aquellos reportados y establecidos para los tres tipos de leche según las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, INVIMA³. Los porcentajes de error obtenidos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Porcentaje de error de los análisis físico-químicos

ANÁLISIS	LECHE ENTERA	VALOR EXPERIMENTAL		VALOR TEÓRICO ³	ERROR (%)	
		UAI	LAB. REF.		UAI	LAB. REF.
ρ (g/mL)	CRUDA	1,0310	1,0300	1,0315	0,05	0,14
	PASTEURIZADA	1,0320	1,0305	1,0315	0,05	0,10
	UHT	1,0310	1,0310	1,0315	0,05	0,05
Acidez (%)	CRUDA	0,133	0,138	0,165	19,4	16,4
	PASTEURIZADA	0,176	0,154	0,165	6,6	6,6
	UHT	0,133	0,136	0,165	19,4	17,5
pH	CRUDA	6,697	6,630	6,600*	1,46	0,45
	PASTEURIZADA	6,597	6,600	6,600*	0,05	0,0
	UHT	6,780	6,760	6,600*	2,72	2,42
G (%)	CRUDA	3,73	3,70	3,0	24,3	23,3
	PASTEURIZADA	3,02	3,20	3,0	0,66	6,6
	UHT	3,29	3,30	3,0	9,6	10,0
ES (%)	CRUDA	12,36	12,08	11,30	9,4	6,9
	PASTEURIZADA	11,66	11,61	11,30	3,1	2,7
	UHT	11,81	11,85	11,30	4,5	4,8
ESD (%)	CRUDA	8,63	8,38	8,30	4,0	1,0
	PASTEURIZADA	8,65	8,41	8,30	4,2	1,3
	UHT	8,52	8,55	8,30	2,6	3,0
PROTEÍNA (%)	CRUDA	2,16	-	3,0**	28,0	-
	PASTEURIZADA	2,84	-	3,0**	5,3	-
	UHT	2,70	-	3,0**	10,0	-
CENIZAS (%)	CRUDA	0,69	-	0,73*	5,4	-
	PASTEURIZADA	0,71	-	0,73*	2,7	-
	UHT	0,72	-	0,73*	1,3	-

* KIRK R.; SAWYER, R. y EGAN, H. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. México: Compañía Editorial Continental S.A de C.V, 1996. **VENTANAS, J. Lactología Técnica: Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. España: Editorial Acriba, 1980

Cuando se evalúa la exactitud de un método, en general se requiere que el valor medido no difiera significativamente del aceptado como referencia³⁵. Los porcentajes de error obtenidos en el laboratorio de la UAI, fueron en su mayoría (a excepción de la acidez, proteína y la grasa 19,4, 28,0 % y 24,3 %, respectivamente) suficientemente bajos, inferiores al 10 %, indicando la proximidad del valor medio al teórico y por consiguiente, la concordancia esperada para considerar la exactitud de los métodos.

En algunos métodos, como es el caso de acidez, proteína y grasa, donde el porcentaje de error para la leche entera cruda proveniente de cantinas fue elevado con respecto al valor medio teórico, este error puede atribuirse a que son componentes variables, dependientes de la raza, época del año, del proceso de ordeño (para el caso de la grasa, la cual sufre un incremento progresivo), e incluso del tipo de alimentación de los animales; por tanto, su contenido puede variar con respecto al valor teórico. Este tipo de variaciones dependen también del estado físico y mental, ya que las emociones, las preocupaciones o la incomodidad, ejercen un efecto adverso tanto en la calidad como en la cantidad de leche que producen los animales¹¹.

Por otra parte, es posible atribuir otro factor que también influyó en la variación de los resultados con respecto al valor teórico; este factor fue la homogenización deficiente de las muestras de leche cruda recogidas en las cantinas.

De igual manera, pueden observarse resultados similares con los porcentajes de error obtenidos para todas las pruebas, por el laboratorio de referencia, incluido el elevado porcentaje de grasa y acidez para la leche entera cruda; esta similitud, implica que realmente existe concordancia entre los resultados obtenidos experimentalmente con los valores teóricos establecidos; permitiendo concluir, que los métodos adaptados por los dos laboratorios para la caracterización físico-química, son adecuados para la obtención de resultados confiables. De igual

manera, puede corroborarse de acuerdo a los resultados, que la industria láctea cumple con las características mínimas de composición, exigidas por las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, INVIMA³ para la producción de leche apta para el consumo humano.

5.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS LECHES UHT COMERCIALES

Se realizó un corto análisis microbiológico, que incluyó examinar la actividad enzimática por medio de la prueba de fosfatasa y la actividad reductora de bacterias, a través de la prueba de TRAM en las muestras de leche UHT adquiridas en los supermercados de la ciudad de Popayán. A continuación, se muestran los resultados en la tabla 17.

Tabla 17. Análisis microbiológico de leches comerciales procesadas térmicamente, enteras, semidescremadas y descremadas

LECHE UHT	TRAM (horas)	FOSFATASA
ALE	7	Negativa
CEV	7	Negativa
PEFeV	7	Negativa
PS	7	Negativa
PSOV	7	Negativa
CSV	7	Negativa
SFS	7	Negativa
ApSV	7	Negativa
ApSCaV	7	Negativa
ApSMV	7	Negativa
PSD	7	Negativa
SFSD	7	Negativa
ApSD	7	Negativa
AISDF	7	Negativa
CSDV	7	Negativa
ApDF	7	Negativa
CDV	7	Negativa
ApD	7	Negativa
AIDF	7	Negativa
PDD	7	Negativa
ApDD	7	Negativa

Considerando que el carácter biológico y lábil de la leche determina que ésta posea una amplia variabilidad en su composición, así como, alta susceptibilidad al desarrollo de microorganismos que contribuyen al rápido deterioro de sus componentes, se hizo necesario comprobar el estado de conservación de las leches UHT procesadas térmicamente, con el objetivo de descartar alguna alteración en su composición, inducida por causas microbiológicas.

Los resultados indican que todas las muestras analizadas están exentas de microorganismos, ya que durante más de las 7 horas dispuestas para el análisis de TRAM, no hubo cambio de color del indicador azul de metileno, debido a la ausencia de bacterias responsables de la reducción de este indicador; así mismo, la prueba de fosfatasa resultó negativa como se esperaba, puesto que esta enzima sólo está activa en la leche cruda, es decir, cuando aún no ha pasado por ningún tipo de tratamiento de pasteurización, lo cual indica que las leches analizadas, fueron sometidas a un eficaz tratamiento de higienización, que garantizó la destrucción de los gérmenes patógenos y por consiguiente, no se esperan alteraciones en su composición, debidas a algún tipo de carga microbiana.

También puede observarse que todos estos resultados se encuentran dentro de los rangos establecidos en las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, INVIMA³ para cada uno de estos tipos de leche (sección 2.3.1), cumpliendo con las exigencias mínimas para aplicar como leches de calidad aptas para consumo ó para ser empleadas como materia prima de derivados lácteos.

5.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS LECHEs UHT COMERCIALES

Se realizó el análisis físico-químico por triplicado, con base a los métodos estandarizados en la UAI-sección alimentos y expuestos en la metodología (sección 4.4), de las muestras de leche adquiridas en los supermercados de la ciudad de Popayán, con el fin de caracterizar la composición de las mismas.

Dado que existe una relación directa entre las concentraciones de algunos de los constituyentes de la leche y el contenido de grasa⁴, las leches analizadas se clasificaron de acuerdo a este contenido como enteras, semidescremadas y

descremadas, con el fin de evaluar la influencia significativa o no de la materia grasa con respecto a parámetros indicativos de calidad como son densidad, extracto seco y extracto seco desengrasado, los cuales, al verse afectados, implicarían la adulteración o alteración de la leche y por ende, la disminución en la calidad de la misma.

De igual manera se calculó s, el intervalo de confianza y DSR para cada uno de los parámetros analizados, con los cuales pudo soportarse la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos (a excepción del valor de DSR = 50% para leches descremadas); ya que los valores para dichas desviaciones fueron inferiores al 0,11, 0,09, 3,7, 6,2, 3,9, 1,4, 3,9 y 8,4 % para densidad, acidez, pH, grasa, ES, ESD, proteína y cenizas, respectivamente. A continuación, los resultados se presentan en las tablas 18, 19 y 20.

Tabla 18. Caracterización físico-química de las leches enteras comerciales procesadas térmicamente

MUESTRA	ρ (g/mL) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	ACIDEZ (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	pH $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	G (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	ES (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	ESD (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	PROTEÍNA (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	CENIZAS (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)
ALE	1,0300 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,147 ± 0,002 ± 0,001 0,68	6,585 ± 0,002 ± 0,001 0,02	3,50 ± 0,10 ± 0,06 1,7	11,88 ± 0,08 ± 0,05 0,42	8,34 ± 0,02 ± 0,01 0,12	2,41 ± 0,02 ± 0,01 1,2	0,73 ± 0,02 ± 0,01 1,4
CEV	1,0330 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,141 ± 0,002 ± 0,001 0,71	6,691 ± 0,002 ± 0,001 0,01	3,10 ± 0,10 ± 0,06 1,9	12,15 ± 0,10 ± 0,06 0,49	9,01 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,60 ± 0,03 ± 0,02 0,77	0,75 ± 0,02 ± 0,01 1,3
PEFeV	1,0330 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,150 ± 0,003 ± 0,002 1,3	6,621 ± 0,002 ± 0,001 0,02	3,00 ± 0,08 ± 0,05 1,6	11,95 ± 0,12 ± 0,07 0,58	8,98 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,64 ± 0,02 ± 0,01 0,37	0,71 ± 0,10 ± 0,06 8,4

* Nivel de confianza para el valor de t es 90%

Tabla 19. Caracterización físico-química de las leches semidescremadas comerciales procesadas térmicamente

MUESTRA	ρ (g/mL)	ACIDEZ (%)	pH	G (%)	ES (%)	ESD (%)	PROTEÍNA (%)	CENIZAS (%)
	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)
PS	1,0320 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,145 ± 0,002 ± 0,001 0,69	6,642 ± 0,003 ± 0,002 0,03	1,60 ± 0,08 ± 0,05 3,1	10,06 ± 0,10 ± 0,06 0,60	8,46 ± 0,05 ± 0,03 0,35	2,46 ± 0,12 ± 0,07 2,8	0,76 ± 0,06 ± 0,04 3,6
PSOV	1,0320 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,147 ± 0,002 ± 0,001 0,68	6,674 ± 0,006 ± 0,004 0,06	1,80 ± 0,08 ± 0,05 2,8	10,30 ± 0,10 ± 0,06 0,58	8,50 ± 0,05 ± 0,03 0,35	2,58 ± 0,06 ± 0,04 1,6	0,75 ± 0,03 ± 0,02 2,6
CSV	1,0330 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,141 ± 0,002 ± 0,001 0,71	6,684 ± 0,005 ± 0,003 0,04	1,60 ± 0,10 ± 0,06 3,7	10,27 ± 0,10 ± 0,06 0,48	8,71 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,58 ± 0,06 ± 0,04 1,6	0,75 ± 0,02 ± 0,01 1,3
SFS	1,0320 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,146 ± 0,003 ± 0,002 1,3	6,610 ± 0,010 ± 0,006 0,09	1,60 ± 0,08 ± 0,05 3,1	10,02 ± 0,12 ± 0,07 1,1	8,45 ± 0,02 ± 0,01 1,4	2,44 ± 0,03 ± 0,02 0,82	0,72 ± 0,03 ± 0,02 2,7
ApSV	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,149 ± 0,002 ± 0,001 0,67	6,644 ± 0,005 ± 0,003 0,05	1,80 ± 0,10 ± 0,06 3,3	10,80 ± 0,18 ± 0,11 1,0	9,00 ± 0,18 ± 0,11 1,2	2,66 ± 0,10 ± 0,06 1,5	0,76 ± 0,02 ± 0,01 1,3
ApSCaV	1,0330 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,154 ± 0,005 ± 0,003 1,9	6,600 ± 0,002 ± 0,001 0,02	1,90 ± 0,08 ± 0,05 2,6	10,67 ± 0,08 ± 0,05 0,46	8,77 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,60 ± 0,03 ± 0,02 0,77	0,81 ± 0,03 ± 0,02 2,4
ApSMV	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,154 ± 0,002 ± 0,001 0,64	6,602 ± 0,003 ± 0,002 0,03	1,80 ± 0,08 ± 0,05 2,8	10,80 ± 0,10 ± 0,06 0,56	9,00 ± 0,05 ± 0,03 0,33	2,73 ± 0,05 ± 0,03 1,1	0,78 ± 0,02 ± 0,01 1,2
PSD	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,148 ± 0,002 ± 0,001 0,68	6,592 ± 0,003 ± 0,002 0,03	1,60 ± 0,10 ± 0,06 3,7	10,52 ± 0,10 ± 0,06 0,47	8,96 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,48 ± 0,05 ± 0,03 1,2	0,73 ± 0,03 ± 0,02 2,7
SFSD	1,0320 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,149 ± 0,003 ± 0,002 1,3	6,540 ± 0,002 ± 0,001 0,02	2,00 ± 0,10 ± 0,06 3,0	10,58 ± 0,10 ± 0,06 0,47	8,56 ± 0,02 ± 0,01 0,12	2,54 ± 0,16 ± 0,10 3,9	0,74 ± 0,02 ± 0,01 1,4
ApSD	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,157 ± 0,002 ± 0,001 0,63	6,601 ± 0,002 ± 0,001 0,02	1,80 ± 0,08 ± 0,05 2,8	10,80 ± 0,08 ± 0,05 0,46	9,00 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,60 ± 0,03 ± 0,02 0,76	0,74 ± 0,02 ± 0,05 0,68
AISDF	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,158 ± 0,003 ± 0,002 1,2	6,524 ± 0,005 ± 0,003 0,04	1,80 ± 0,08 ± 0,05 2,8	10,80 ± 0,08 ± 0,05 0,46	9,00 ± 0,02 ± 0,01 0,11	2,64 ± 0,12 ± 0,07 2,6	0,72 ± 0,03 ± 0,02 2,7
CSDV	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,141 ± 0,003 ± 0,002 1,4	6,673 ± 0,003 ± 0,002 0,03	1,80 ± 0,08 ± 0,05 2,8	10,80 ± 0,18 ± 0,11 1,0	9,00 ± 0,03 ± 0,02 0,22	2,61 ± 0,06 ± 0,04 1,5	0,72 ± 0,02 ± 0,01 1,3

Tabla 20. Caracterización físico-química de las leches descremadas comerciales procesadas térmicamente

MUESTRA	ρ (g/mL)	ACIDEZ (%)	pH	G (%)	ES (%)	ESD (%)	PROTEÍNA (%)	CENIZAS (%)
	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ s DSR (%)
ApDF	1,0360 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,142 ± 0,002 ± 0,001 0,70	6,577 ± 0,002 ± 0,001 0,02	0,10 ± 0,08 ± 0,05 50	9,26 ± 0,08 ± 0,05 0,53	9,16 ± 0,08 ± 0,05 0,54	2,60 ± 0,03 ± 0,02 0,77	0,75 ± 0,02 ± 0,01 1,3
CDV	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,142 ± 0,003 ± 0,002 1,4	6,700 ± 0,003 ± 0,002 0,03	ND	8,50 ± 0,00 ± 0,00 0,0	8,50 ± 0,00 ± 0,00 0,0	2,64 ± 0,16 ± 0,10 3,7	0,71 ± 0,02 ± 0,01 1,4
ApD	1,0350 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,153 ± 0,003 ± 0,002 1,3	6,582 ± 0,002 ± 0,001 0,02	0,10 ± 0,08 ± 0,05 50	9,01 ± 0,08 ± 0,05 0,55	8,91 ± 0,08 ± 0,05 0,56	2,66 ± 0,06 ± 0,04 1,5	0,77 ± 0,02 ± 0,01 1,2
AIDF	1,0340 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,156 ± 0,003 ± 0,002 1,2	6,574 ± 0,008 ± 0,005 0,08	0,20 ± 0,08 ± 0,05 25	8,88 ± 0,08 ± 0,05 0,56	8,68 ± 0,08 ± 0,05 0,58	2,61 ± 0,06 ± 0,04 1,5	0,78 ± 0,02 ± 0,02 2,5
PDD	1,0340 ± 0,0020 ± 0,0012 0,11	0,150 ± 0,002 ± 0,001 0,66	6,586 ± 0,003 ± 0,002 0,03	0,10 ± 0,08 ± 0,05 50	8,84 ± 0,23 ± 0,14 1,6	8,74 ± 0,23 ± 0,14 1,6	2,48 ± 0,05 ± 0,03 1,2	0,76 ± 0,02 ± 0,02 2,6
ApDD	1,0350 ± 0,0003 ± 0,0002 0,02	0,157 ± 0,002 ± 0,001 0,63	6,545 ± 0,002 ± 0,001 0,02	ND	8,75 ± 0,00 ± 0,0 0,0	8,75 ± 0,00 ± 0,00 0,0	2,70 ± 0,03 ± 0,02 0,74	0,74 ± 0,02 ± 0,01 1,3

Densidad. Como se observa en las tablas 18, 19 y 20, la densidad de las leches enteras estuvieron comprendidas en el rango de 1,030-1,033 g/mL, las semidescremadas entre 1,032-1,034 g/mL y las descremadas entre 1,034-1,036 g/mL. Estos valores están íntimamente relacionados con el contenido de lípidos, ya que la grasa es el único constituyente con menor densidad que el agua y es el factor que más influye al bajar la gravedad específica de la leche¹⁸; es por esta razón que se observa en los resultados un aumento en la densidad de las leches semidescremadas y aún más significativo en las leches descremadas; sin embargo, estos aumentos están acorde con los valores establecidos por la norma³ (sección 2.3.1) para cada uno de los grupos de leche. Por otra parte, el análisis estadístico (Anexo II); reportó para cada grupo, diferencias significativas entre las leches de cada grupo, respecto a este parámetro. ;

Con los resultados de densidad obtenidos para las leches deslactosadas, incluidas en las leches semidescremadas y descremadas, puede confirmarse que la grasa es el factor más influyente al bajar la gravedad específica de la leche, puesto que los valores obtenidos para ellas se encuentran dentro de los respectivos rangos establecidos para estos grupos, pues el contenido de lactosa no influye en la densidad de estas leches.

Acidez. De igual manera, los valores de acidez calculados para las leches enteras, semidescremadas y descremadas, estuvieron comprendidos en los rangos de 0,141-0,150 %, 0,141-0,158 % y 0,142-0,157 % respectivamente, rangos que se encuentran dentro de los valores que establece la norma (0,140-0,190 %)³ para estos tipos de leche; sin embargo, entre las leches analizadas en cada grupo el análisis estadístico reportó diferencias significativas entre ellas (Prueba de kruskal Wallis para acidez, Anexo II). Estos resultados demuestran una acidez natural o aparente, debida a fosfatos y citratos ácidos presentes en la leche, así como, al dióxido de carbono disuelto en ella^{10, 11}, más no, a una acidez debida a la acción de microorganismos, ya que de acuerdo al análisis

microbiológico realizado (TRAM) con anterioridad (sección 5.2), no se esperaba ningún tipo de alteración causada por bacterias, ya que el tratamiento térmico resultó óptimo y esto garantiza la destrucción de gérmenes patógenos que pudieran causar cierto grado de acidez.

pH. Respecto a los resultados obtenidos para los parámetros no establecidos por la norma, como es el caso del pH, que se encuentra en las leches enteras, semidescremadas y descremadas. Los valores se encuentran entre 6,586-6,91, 6,524-6,684 y 6,545-6,700 respectivamente, valores comprendidos dentro del rango referenciado en la literatura (6,500-6,700)¹¹ y a quienes se le atribuye la ligera acidez normal de la leche. Su determinación como parámetro indicativo de calidad, se incluyó por ser de alguna manera, más significativo, ya que sus valores están relacionados directamente con la acción de enzimas, la precipitación de la caseína, la acción de bacterias acidificantes (valores de pH más bajos) capaces de fermentar lactosa a ácido láctico, condiciones anormales de leches procedentes de vacas con mastitis (valores de pH más altos), el gusto a ácido y el cambio de color o viraje de los indicadores¹⁸.

Grasa. Según el contenido de materia grasa obtenido para las leches analizadas, 3,00-3,50 % para leches enteras, 1,60-2,00 % para leches semidescremadas y de 0,0-0,2 % para leches descremadas, puede evidenciarse que las leches enteras tienen un porcentaje de grasa mayor que los otros tipos de leche. Debido a que durante su tratamiento, no han sido sometidas a un proceso de desnatado como es el caso de las leches semidescremadas y descremadas, razón por la cual, conservan su nivel mayoritario de grasa. Para las semidescremadas, el desnatado es parcial como lo indican los resultados y casi en su totalidad para las descremadas, pues los valores de 0,0 % encontrados para las leches descremadas CDV y ApDD, no indican la totalidad del desnatado sino, que su contenido en grasa es mucho menor al que se puede detectar con el butirómetro de escala 0-8% que se empleó.

Por otra parte el contenido de grasa presentó diferencias significativas entre las leches de cada grupo con la Prueba de kruskal Wallis, reportada en el Anexo II.

Comparando los resultados obtenidos para la grasa con aquellos reportados en la información nutricional de cada leche (Anexo I), pudo observarse que en los grupos de las leches semidescremadas y descremadas hubo una mínima discrepancia de los resultados obtenidos respecto a los valores reportados, pero donde se presentó más variación, fue en las leches descremadas ApDF, CDV, y AIDF. Se considera que estas pequeñas variaciones son, más que una diferencia, una consecuencia de la amplitud de la escala comprendida en el butirómetro empleado, para lograr la detección de cantidades de grasa tan pequeñas, ó en su defecto, son una consecuencia de la carbonización de la grasa, ya que al ser tan poca, se hace más vulnerable a la acción carbonizante del ácido empleado en la determinación y por ende, se hace una detección errónea del verdadero porcentaje.

Adicionalmente, los tres grupos de leches mostraron porcentajes de grasa que concuerdan con los valores referenciados en la norma (sección 2.3.1) y que permitieron clasificarlas para evaluar la relación influyente de la grasa respecto a los demás componentes.

ES Y ESD. Esta influencia que ejerce la grasa, también se refleja en el porcentaje de sólidos totales ó extracto seco; por lo tanto, una disminución en el contenido de materia grasa, reduce los valores de extracto seco y extracto seco desengrasado*, hecho que es claramente corroborado con los resultados obtenidos, puesto que las leches que presentaron mayores valores de ES y ESD (11,88-12,15 % y 8,34-9,01 %, respectivamente), fueron las leches enteras; las que presentaron un valor

* CALDERÓN, A; RODRÍGUEZ, V y VÉLEZ, S. Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el Municipio de Montería, Colombia. MVZ Córdoba. Vol 12. 2007. p. 912-920

intermedio (10,06-10,80 % y 8,45-9,00 %, respectivamente), fueron las leches semidescremadas y las descremadas presentaron menores porcentajes (8,50-9,26 % y 8,50-9,16 %, respectivamente). De igual manera, según el análisis estadístico (Kruskal Wallis), se presentaron diferencias significativas entre las leches de cada grupo, la descripción de la prueba se reporta Anexo II.

Respecto a los valores mínimos establecidos por la norma (sección 2.3.1) para ES y ESD, la mayoría de las leches analizadas cumplen con la legislación; sin embargo, dentro del grupo de las leches enteras, la CEV y la PEFev, presentaron un alto valor de ES (12,15 y 11,95 % respectivamente) y ESD (9,01 y 8,98 %, respectivamente). Estas fluctuaciones son posibles debido al alto contenido de otros componentes diferentes a la grasa, como pueden ser las proteínas, azúcares, sales minerales y vitaminas*, pues para los tres casos, la grasa está cumpliendo con su valor establecido. En el Anexo I, puede observarse cómo estas leches presentan porcentajes considerables de Na, Ca y de vitaminas, que estarían aportando al valor de extracto seco.

Proteína. El porcentaje de proteína calculado para las leches analizadas, estuvo comprendido en el rango de 2,41-2,73 % presentando algunas diferencias entre ellas (Prueba de Kruskal Wallis, Anexo II). Como se observa en las tablas 18, 19 y 20, la mayor variabilidad composicional a nivel general, la exhibió el porcentaje de proteína el cual está por debajo del valor mínimo (3,0)³⁹ establecido en la literatura y casi en general, al reportado en la información nutricional de las leches analizadas (Anexo I).

Las leches que reportan en la tabla nutricional valores inferiores a 3,0 y similares a los obtenidos experimentalmente son: ApSV, ApSCaV, ApSMV, SFSD, ApSD, ApD y ApDD. Esto es posible en la mayor parte de los casos, a los procesos de industrialización para el enriquecimiento con minerales como Na, Ca, Fe, P y Zn adicionados a estas leches, puesto que tienen efectos negativos sobre el valor

nutritivo de las proteínas; a veces se dan reacciones desfavorables, habitualmente en la estructura primaria, con una disminución del contenido en aminoácidos esenciales o formación de derivados antinutritivos^{4, 9}. Tratamientos térmicos como la esterilización, a temperaturas de 115 °C, acarrearán la liberación parcial de sulfuro de hidrógeno procedente de residuos de cisteína y cistina, cierta desfosforilización de restos de serina y una disminución de la disponibilidad de lisina⁹. Partiendo de este antecedente y sumando el hecho de que la no homogeneidad de las proteínas dificulta su determinación¹⁴, se considera entonces que los resultados están sujetos a las variaciones presentadas en los aminoácidos, e inducidas por el calentamiento a 130 °C.

Aunque las micelas de caseína son notablemente estables a temperaturas de hasta 140 °C, las proteínas del lactosuero son relativamente termolábiles, sufriendo una intensa desnaturalización a 80 °C¹³.

Las proteínas del suero contienen aminoácidos azufrados muy lábiles al calor y las temperaturas de pasterización pueden desnaturalizar una fracción de ellas con la consecuente producción de grupos sulfhidrilos muy reactivos, que a su vez actúan como antioxidantes. Su desnaturalización es relativamente fácil, ya que su conformación globular es rápidamente destructible debido a su alto contenido de aminoácidos azufrados, acompañada por la liberación de grupos sulfhidrilo. Estos se producen cuando la proteína se desdobra y los expone abiertamente, de tal manera que son fácilmente hidrolizables o bien provienen del rompimiento de los enlaces disulfuro⁴.

Los cambios químicos de las proteínas catalizados por el calor son muy variados y dependen básicamente de la susceptibilidad de sus diferentes aminoácidos. Desde el punto de vista de la nutrición, la pérdida de aminoácidos indispensables, es tal vez el mayor daño que le puede suceder a las proteínas, ya que repercute en una disminución del valor nutritivo del producto en el momento del consumo^{4, 13}.

Cenizas. Otro de los parámetros determinados y que no se encuentra establecido por la norma, es el porcentaje de cenizas, el cual se encontró en un rango de 0,71 a 0,75 %, 0,74 a 0,81 % y 0,71 a 0,78 % para las leches enteras, semidescremadas y descremadas, respectivamente. Respecto a estos rangos y la diferencia en el tipo de leche, no se encuentra una diferencia significativa entre ellos y respecto a las leches del conjunto de las enteras; sin embargo para las leches analizadas en los grupos de las semidescremadas y las descremadas, si se presentaron diferencias significativas (Prueba de Kruskal Waillis para cenizas, Anexo II), lo cual indica que no es un parámetro dependiente del contenido de grasa.

De acuerdo con el rango reportado en la literatura (0,71 a 0,75 %)¹¹, solamente las leches enteras estarían cumpliendo con el rango establecido, aún existiendo una leche enriquecida con hierro (PEFeV) para la cual se esperaría un mayor porcentaje, como en el caso de las leches ApSCaV, ApSMV y ApD; sin embargo, para estas tres últimas leches, es posible atribuir su elevado y significativo valor de cenizas, a los considerables porcentajes de Fe, Ca, Zn, Na y P, con que han sido enriquecidas (Anexo I).

Finalmente, este diagnóstico preliminar, permitió verificar la calidad de las leches analizadas y por consiguiente, el cumplimiento de las normas legislativas, respecto a la composición mínima que debe presentar una leche UHT apta para el consumo.

5.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTULOSA

Ya caracterizadas las 21 muestras de leches comerciales, se continuó con la optimización del método espectrofotométrico que permitió la determinación sencilla

y confiable de lactulosa, mediante la adecuada elección de la longitud de onda y del método de cuantificación.

Sin embargo, previamente a la determinación de lactulosa en las leches comerciales analizadas, se llevó a cabo la calibración de los equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100, con el fin de obtener datos confiables y reproducibles.

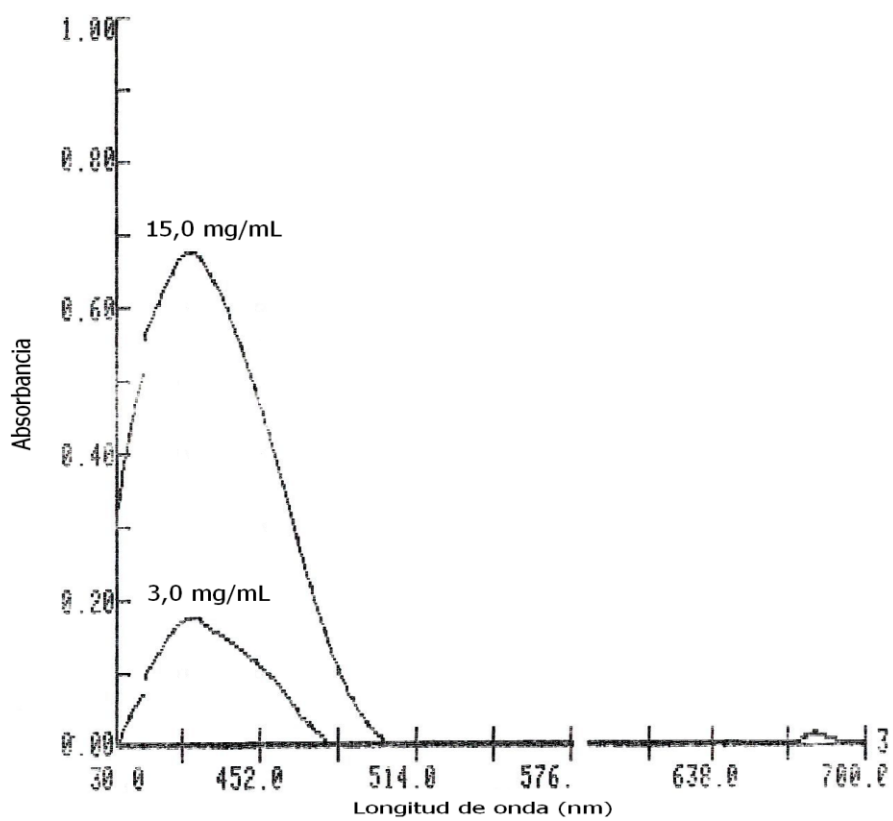
5.4.1 Calibración de los espectrofotómetros: la calibración realizada a los espectrofotómetros UV-visible, estableció el grado de error de la señal obtenida con cada equipo, ya que los patrones de dicromato empleados, tienen una magnitud de absorción exactamente conocida (373 nm), la cual permaneció constante en cada ensayo, permitiendo la obtención de curvas de calibración con muy buenas linealidades, tales como, $r=0,99998$ y $r=0,99997$ para el equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100, respectivamente.

Los resultados obtenidos durante la calibración con óxido de holmio en el equipo INTRALAB DMS-100, mostró espectros con picos agudos característicos en este tipo de celda con longitudes de onda de (637,5, 536,4, 453,4, 418,5, 360,8, 287,6 y 279,3 nm). En algunos casos, se presentaron variaciones de $\pm 1,0$ nm, pero estos son valores permitidos dentro de la calibración con esta celda.

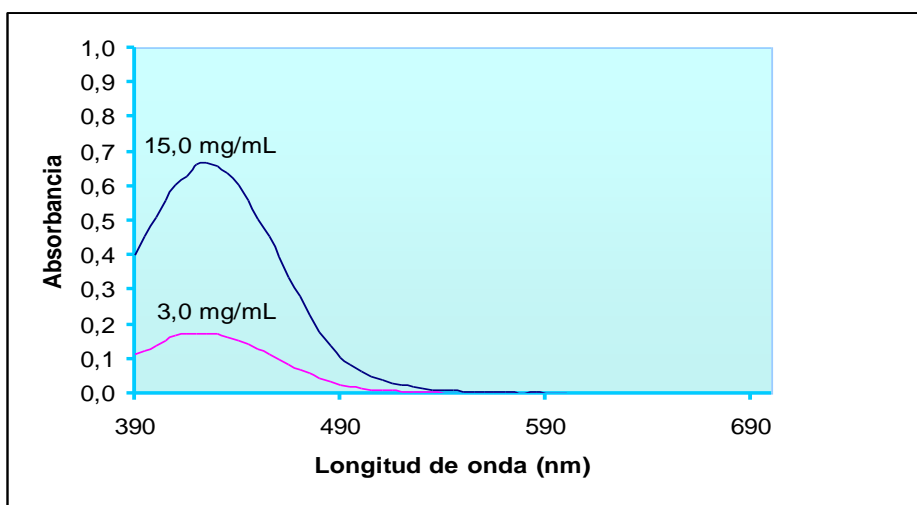
5.4.2 Elección de longitud de onda: se realizó un barrido en la región visible con dos concentraciones diferentes de patrones de lactulosa, alcanzándose un máximo de absorción a 425 nm en el espectrofotómetro THERMO GENESYS 6 y de 423,1 nm en el espectrofotómetro INTRALAB DMS-100, como se muestra en la figura 12.

Sin embargo, para establecer un punto de comparación entre las sensibilidades (cambio de absorbancia por unidad de concentración) de ambos equipos y considerando el hecho de que toda absorción ocurre sobre un rango de longitudes de onda alrededor de un máximo discernible⁴², se dispuso como condición de

trabajo para las mediciones de absorbancia espectrofotométricas, una longitud de onda de máxima absorbancia a 425 nm.



a



b

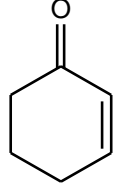

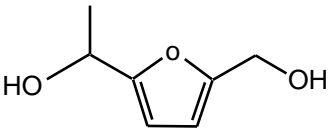
Figura 12. Espectros de absorción de lactulosa de concentraciones de 3,0 mg/mL y 15,0 mg/mL. a) Espectrofotómetro INTRALAB-DMS-100 y b) Espectrofotómetro THERMO GENESYS 6

Los espectros de la figura 12, verifican la proporcionalidad existente entre la concentración de lactulosa y la absorbancia postulada según la ley de Beer, e igualmente, presentaron buena resolución.

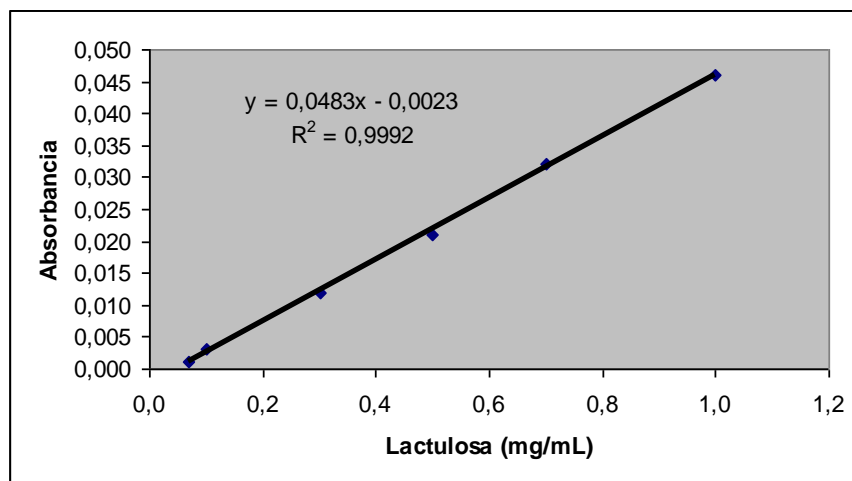
Adicionalmente, se comprobó si la estructura de la molécula obtenida de la reacción de Claisen-Schmidt entre la antrona y el producto de deshidratación del carbohidrato, correspondía a la especie absorbente a una longitud de onda de 425 nm; para esto, se realizó un análisis teórico acerca de la posición del máximo de absorción y este tratamiento teórico se realizó con base a las reglas de Woodward–Fieser⁴³. El resultado fue una longitud de onda máxima a 432 nm (Ver tabla 21). Comparando esta longitud teórica con la longitud de onda experimental (425 nm), se infiere un desplazamiento de esta última hacia longitudes de onda más cortas, cuyo desplazamiento está asociado con las transiciones $n \rightarrow \pi^*$, conocidas como desplazamiento hipsocrómico, el cual es ejercido por el efecto polar del solvente³⁸.

El efecto hipsocrómico surge aparentemente, de una mayor solvatación del par de electrones no enlazantes de la cetona α,β -insaturada involucrada en la estructura (Ver figura 7), solvatación que disminuye la energía del orbital n ³⁸.

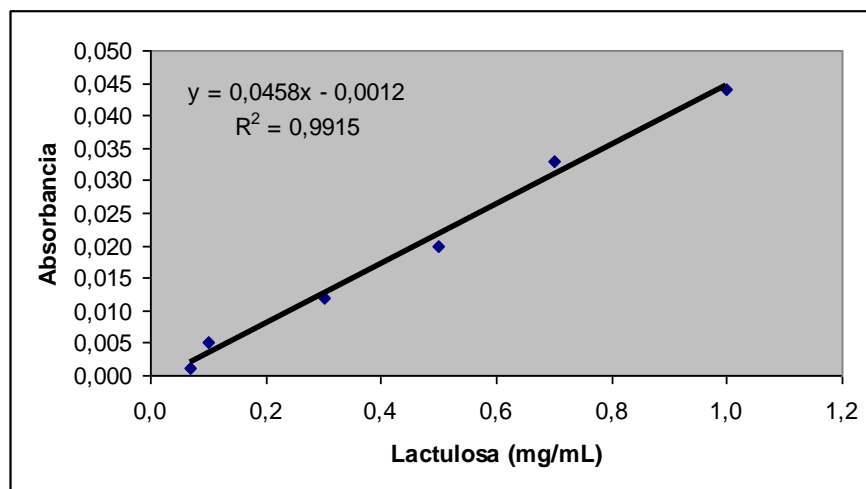
Tabla 21. Longitud de onda teórica según las reglas de Woodward – Fieser⁴³

<p>SISTEMA BASE: Enona aromática en anillo de seis miembros</p> 	215
<p>Extensión por doble enlace conjugado adicional (+30) (Ver figura 7)</p>	150
<p>Componente homodieno (+39)</p> 	39
<p>Residuo de anillo, posición α (+10) (Ver figura 7)</p>	10
<p>Sustituyente alquil, posición γ (+18)</p> 	18
<p>λ máxima absorción calculada (nm)</p>	432

5.4.3 Método de cuantificación: la cuantificación de la lactulosa presente en las muestras de leche se realizó mediante curva de calibración preparando seis soluciones del patrón (0,07, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 y 1,0 mg/mL). De cada solución se registraron cinco lecturas de absorbancia y la medición se llevó a cabo de menor a mayor concentración. En la figura 13 se presentan las curvas de calibración para cada equipo.



a



b

Figura 13. Curvas de calibración para la determinación de lactulosa: a) THERMO GENESYS 6, b) INTRALAB – DMS 100

5.5 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LACTULOSA

Una vez seleccionada la longitud de onda donde se presentó la mayor sensibilidad (cambio en la absorbancia por unidad de concentración) de las mediciones espectrofotométricas, se procedió a optimizar las condiciones particulares del

laboratorio y los parámetros confirmaron la confiabilidad de los resultados obtenidos. Dichos parámetros se enuncian a continuación.

5.5.1 Linealidad: se evaluó la linealidad en cada equipo, a partir de dos curvas patrón de lactulosa comprendidas en el rango de concentraciones de 0,07 a 1,0 mg/mL, y abarcaron los niveles de lactulosa encontrados en las muestras de leche analizadas. Las gráficas de absorbancia promedio (\bar{A}) con su respectiva concentración (X), se les realizó un análisis por regresión lineal, que dio lugar a las siguientes ecuaciones:

$$\text{THERMO GENESYS 6: } \bar{A} = 0,0483X - 0,0023 \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$\text{INTRALAB - DMS 100: } \bar{A} = 0,0458X - 0,0012 \quad (\text{Ecuación 11})$$

con un coeficiente de linealidad de $r = 0,9996$ y $r = 0,9957$, respectivamente.

Estas rectas y los coeficientes de correlación obtenidos, reflejan la respuesta lineal del método analítico en el rango de concentraciones trabajadas. Sin embargo, para corroborar dicha linealidad, se aplicó un test estadístico para $n-2$ grados de libertad y un 95 % de confianza, con el cual se encontró una correlación lineal significativa para ambos equipos ya que $t_{\text{calculada}} > t_{\text{tabulada}}$.

$$\text{THERMO GENESYS 6: } 70,894 \gg 2,772$$

$$\text{INTRALAB - DMS 100: } 21,598 \gg 2,772$$

5.5.2 Precisión

5.5.2.1 Repetibilidad del método: la repetibilidad del método completo (incluida la preparación de la muestra hasta el análisis por la técnica), fue determinado midiendo diez alícuotas de una muestra de leche ApSCaV y diez alícuotas de dos

soluciones patrón de lactulosa (0,1 y 0,3 mg/mL), durante diez días consecutivos, obteniéndose los datos que se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Repetibilidad del método de la lactulosa, usando los equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB – DMS 100

DÍA	THERMO GENESYS 6			INTRALAB DMS - 100		
	ApSCaV	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL	ApSCaV	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL
1	0,007	0,003	0,012	0,007	0,005	0,013
2	0,007	0,003	0,011	0,006	0,004	0,012
3	0,007	0,003	0,012	0,006	0,004	0,012
4	0,007	0,003	0,013	0,006	0,004	0,013
5	0,007	0,003	0,012	0,006	0,004	0,011
6	0,006	0,003	0,012	0,006	0,004	0,013
7	0,006	0,003	0,012	0,006	0,004	0,012
8	0,007	0,003	0,011	0,006	0,004	0,012
9	0,007	0,004	0,011	0,006	0,004	0,011
10	0,007	0,003	0,012	0,006	0,004	0,012
Ā	0,007	0,003	0,012	0,006	0,004	0,012
S	0,000 ₄	0,000 ₃	0,000 ₆	0,000 ₃	0,000 ₃	0,000 ₇
$\frac{tS}{\sqrt{N}}$	0,000 ₂	0,000 ₂	0,000 ₃	0,000 ₂	0,000 ₂	0,000 ₄
DSR (%)	5,7	10	5,0	5,0	7,5	5,8

* Nivel de confianza para el valor de t es 90%

Teniendo en cuenta que la complejidad de la matriz en el análisis de fluidos biológicos no permite obtener una DSR $\leq 2\%$, resultan apropiadas DSR de 5 a 10%, ó mayores³⁵. Como se observa en la tabla 22, las DSR calculadas, ingresan dentro de este rango apropiado, siendo del 5,7 y 5,0 % para la muestra ApSCaV de concentración 1,8 mg/mL y para los patrones de 0,1 y 0,3 mg/mL, 10 y 5,8 %.

El conjunto de estos resultados permiten concluir que la precisión del método, incluida la preparación de la muestra y el análisis por espectrofotometría, es adecuada para la obtención de datos repetitivos para la determinación de lactulosa en leches, a partir de la concentración de 0,1 mg/mL.

De igual manera, se realizó un análisis de significancia, para conocer si los valores de absorbancia dependen significativamente del equipo utilizado; el análisis reporto tanto para la muestra como para las concentraciones de 0,1 y 0,3 mg/mL, valores de t calculados, inferiores a t tabulado para 9 grados de libertad, indicando que no existen diferencias significativas entre los datos obtenidos en ambos equipos, para una misma concentración. La descripción del análisis se encuentra en el Anexo II.

5.5.2.2 Repetibilidad ó precisión espectrofotométrica: la repetibilidad ó precisión espectrofotométrica, se estableció mediante lecturas repetidas (N=5) de la absorbancia de los patrones (0,1 y 0,3 mg/mL) y de la muestra de leche ApSCaV en diferentes días. Los resultados se encuentran tabulados en la tabla 23.

Tabla 23. Repetibilidad espectrofotométrica de la lactulosa, usando los equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB – DMS 100

DÍA	THERMO GENESYS 6			INTRALAB DMS – 100		
	ApSCaV	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL	ApSCaV	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL
1	0,006	0,004	0,012	0,006	0,004	0,012
2	0,006	0,004	0,012	0,006	0,003	0,012
3	0,005	0,003	0,012	0,005	0,003	0,010
4	0,005	0,003	0,011	0,004	0,002	0,010
5	0,005	0,002	0,011	0,004	0,002	0,010
Ā	0,005	0,003	0,012	0,005	0,003	0,011
S	0,000 ₅	0,000 ₈	0,000 ₅	0,001 ₀	0,000 ₈	0,001 ₀
$\frac{ts}{\sqrt{N}}$	0,000 ₄	0,000 ₇	0,000 ₄	0,000 ₉	0,000 ₇	0,000 ₉
DSR (%)	10,0	26,6	4,2	20,0	26,6	9,1

* Nivel de confianza para el valor de t es 90%

En la tabla 23 se muestra de manera general, que en ambos equipos, la desviación estándar relativa obtenida para determinar precisión espectrofotométrica con el patrón de concentración 0,1 mg/mL es bastante alta, Esto lleva a concluir que posiblemente su cercanía a la mínima concentración cuantificable bajo las condiciones establecidas del método analítico le confiere una variabilidad considerable en su medida. Por otra parte, también es posible observar que la precisión es mas razonable y aceptable para la muestra de leche ApSCaV con una concentración de lactulosa de 1,8 mg/mL y el patrón de concentración 0,3 mg/mL, en los dos equipos.

5.5.3 Sensibilidad: con el fin de conocer la sensibilidad del método analítico para la determinación de lactulosa en las muestras de leche comerciales, se determinó el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), siguiendo el mismo procedimiento reportado en el apartado 4.6.3. De las diez réplicas hechas al

blanco y a las concentraciones más bajas (0,07, 0,1 y 0,3 mg/mL), se obtuvieron respectivamente, valores de absorbancia promedio de 0,0002, 0,001, 0,003 y 0,012 en el equipo THERMO GENESYS 6 y 0,0002, 0,001, 0,004 y 0,012 en el equipo INTRALAB DMS-100, respectivamente.

Al cociente calculado, del promedio de cada patrón entre el promedio del blanco, se le analizó la relación señal/ruido correspondiente al LD y al LC; los valores obtenidos del análisis para cada patrón fueron promediados para obtener LD y LC, con sus respectivas desviación estándar, intervalo de confianza y desviación estándar relativa, siendo esta última del 33,344,4 % para el LD en el equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100 y del 59,0 y 73,7 % para el LC, respectivamente para cada equipo.

A continuación, en la tabla 24 se muestran los límites de detección y de cuantificación calculados para el método.

Tabla 24. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC). Equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS - 100

EQUIPO	LD (mg/mL)	S	$\frac{ts}{\sqrt{N}}$	RSD (%)	LC (mg/mL)	S	$\frac{ts}{\sqrt{N}}$	RSD (%)
THERMO GENESYS 6	0,026	0,012	0,020	44,4	0,083	0,049	0,082	59,0
INTRALAB DMS-100	0,026	0,012	0,020	44,4	0,080	0,052	0,087	73,7

* Nivel de confianza para el valor de t es 90%

El límite de detección obtenido fue de 0,026 mg/mL para el equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100, calculados como la cantidad necesaria para obtener una relación señal/ruido de 3.

El límite de cuantificación obtenido fue de 0,083 mg/mL para el equipo THERMO GENESYS 6 y 0,080 mg/mL para el equipo INTRALAB DMS-100, calculados como la cantidad necesaria para obtener una relación señal/ruido de 10.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la diferencia en cuanto a sensibilidad de los equipos, no es significativa; hecho que puede ser corroborado con el análisis de varianza reportado en la sección 5.2.2.1 y descrito en el anexo II; donde $p > 0,05$, indicando que el valor de absorbancia no difiere significativamente de un equipo a otro.

Por otra parte, el resultado del límite de cuantificación (0,08 mg/mL en los dos equipos) y los altos porcentajes de DSR, soportan la idea que se tenía respecto a la alta dispersión presentada por la concentración 0,07 mg/mL; donde se estimaba una posible cercanía de la concentración con el límite de cuantificación, y los resultados están reportando que dicho límite se encuentra por encima de esta concentración, lo cual justifica la variabilidad en las medidas.

5.5.4 Exactitud del método. Para conocer la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia (curva de calibración), se evaluó la exactitud en términos del porcentaje de recuperación de la lactulosa. Para ello, se empleó una muestra de leche (PS) y una solución patrón de 0,1 mg/mL, a las cuales se les agregó cierta cantidad conocida de una solución patrón de mayor concentración (1,0 mg/mL). Los datos se resumen en la tabla 25.

Tabla 25. Porcentaje de recuperación de la lactulosa por espectrofotometría UV-visible. Equipos THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS - 100

MUESTRA Ó PATRÓN	EQUIPO	CANTIDAD INICIAL	CANTIDAD AÑADIDA	CANTIDAD RECUPERADA ± s DSR (%)	RECUPERACIÓN ± s DSR (%)
		mg			(%)
PS	THERMO GENESYS 6	0,5	10,0	0,64 ± 0,01 1,6	90,8 ± 1,2 1,3
	INTRALAB DMS – 100	0,5	10,0	0,66 ± 0,01 1,5	93,1 ± 1,5 1,6
0,1 mg/mL	THERMO GENESYS 6	0,5	10,0	0,66 ± 0,00 0,0	94,2 ± 0,00 0,0
	INTRALAB DMS – 100	0,5	10,0	0,67 ± 0,01 1,4	96,0 ± 1,5 1,6

Los porcentajes de recuperación de lactulosa obtenidos, fueron de 90,8 y 94,2 % respectivamente, para la muestra de leche PS y el patrón en el equipo THERMO GENESYS 6, y de 93,1 y 96,0 % respectivamente, para la muestra de leche PS y el patrón en el equipo INTRALAB DMS–100, esto indica que junto con los bajos DSR calculados para las cinco medidas, la exactitud del método analítico empleado permite recuperar un porcentaje considerable del carbohidrato. Adicionalmente, estos valores están por encima de las consideraciones habituales y aceptadas para el análisis de fluidos biológicos, considerados matrices complejas, donde se han encontrado valores entre el 60 y 80 % de recuperación³⁵; esta ventaja indica que son resultados óptimos para determinar lactulosa por este método analítico.

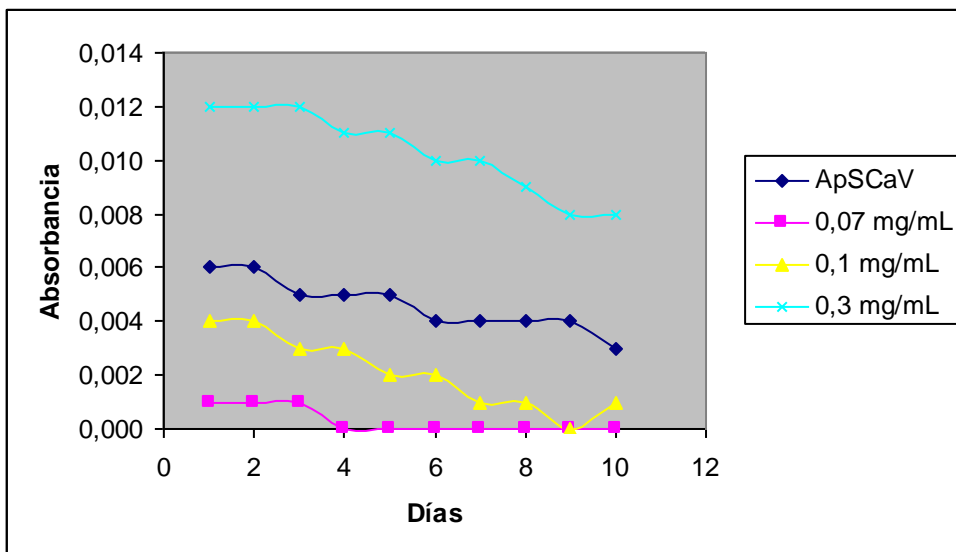
5.6 ESTABILIDAD DE LA LACTULOSA

Se determinó el tiempo y condiciones bajo las cuales, una muestra preparada puede ser reproducible. A continuación, los resultados se indican en la tabla 26.

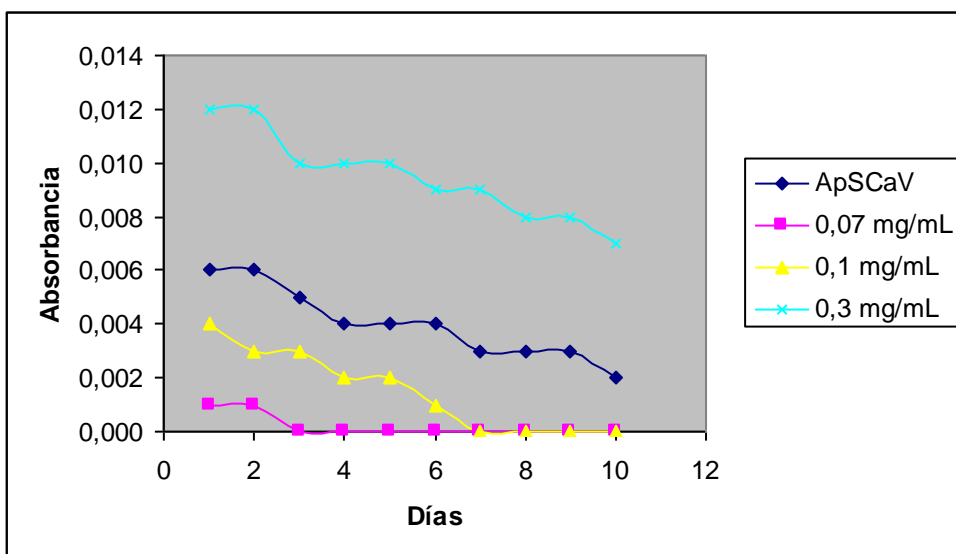
Tabla 26. Datos de estabilidad de patrones de lactulosa de concentraciones 0,07, 0,1 y 0,3 mg/mL y de una muestra de leche (ApSCaV) en diferentes días. Equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS - 100

DÍA	THERMO GENESYS 6				INTRALAB DMS-100			
	ApSCaV	0,07 mg/mL	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL	ApSCaV	0,07 mg/mL	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL
1	0,006	0,001	0,004	0,012	0,006	0,001	0,004	0,012
2	0,006	0,001	0,004	0,012	0,006	0,001	0,003	0,012
3	0,005	0,001	0,003	0,012	0,005	0,000	0,003	0,010
4	0,005	0,000	0,003	0,011	0,004	0,000	0,002	0,010
5	0,005	0,000	0,002	0,011	0,004	0,000	0,002	0,010
6	0,004	0,000	0,002	0,010	0,004	0,000	0,001	0,009
7	0,004	0,000	0,001	0,010	0,003	0,000	0,000	0,009
8	0,004	0,000	0,001	0,009	0,003	0,000	0,000	0,008
9	0,004	0,000	ND	0,008	0,003	0,000	0,000	0,008
10	0,003	0,000	0,001	0,008	0,002	0,000	0,000	0,007
Ā	0,005	ND	0,002	0,010	0,004	ND	0,002	0,010
S	0,001	---	0,001	0,002	0,001	---	0,001	0,002
DSR (%)	20,0	--	50,0	20,0	25,0	--	50,0	20,0

La alta dispersión de las medidas respecto a su valor medio, advierten acerca de una posible degradación de lactulosa bajo las condiciones experimentales y de almacenamiento trabajadas, al transcurrir un tiempo de tres días según los resultados. La tendencia que presentan estas soluciones al ser estables durante este corto tiempo, se representa en la figura 14.



a.



b.

Figura 14. Estabilidad en la concentración de lactulosa respecto al tiempo: a. THERMO GENESYS 6, b. INTRALAB DMS-100

La tendencia que se muestra en las gráficas, con respecto a la pérdida de lactulosa durante diez días consecutivos, corrobora la dispersión de los datos y permite concluir que la obtención de datos confiables para la estimación de lactulosa en leches líquidas, puede hacerse durante los dos primeros días de

preparada la muestra, mientras se almacene en un vial de vidrio con tapa rosca, selladas herméticamente y a una temperatura de 4°C. La manipulación de la muestra debe hacerse lo más rápido posible, para evitar la volatilización del metanol y por consiguiente el aumento en la concentración de lactulosa, generando así datos erróneos.

5.7 EXTRACCIÓN DE LACTULOSA Y OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ABSORBENTE

Para llevar a cabo la determinación de lactulosa en muestras de leche, las cuales implican un grado de complejidad de la matriz, y considerando que la metodología empleada (Esquema 2) había sido aplicada anteriormente a mezclas preparadas de lactosa-lactulosa, fue necesario adaptar una extracción de la mezcla de carbohidratos en las leches a analizar. Para ello, nos basamos en la metodología empleada en cromatografía de gases³⁷ (sección 4.8.1), la cual, gracias a estudios también realizados con anterioridad, se garantizó que la relación 1:10 de leche en metanol era óptima para conseguir la completa precipitación de la grasa y la fracción proteínica de la leche, debida a la alta solubilidad que presenta la lactosa y la lactulosa en alcoholes⁴¹. Sin embargo, como se indica en la sección 4.8.1, se requirió prolongar el tiempo de reposo en la nevera hasta el día siguiente (24 horas), para evitar la volatilización del metanol y conseguir la precipitación completa de las proteínas.

De igual manera, considerando que el método de la antrona es un método apto para determinar diferentes carbohidratos por simple variación en la concentración del ácido y de la temperatura de calentamiento⁴⁰, se requirió la optimización de dichas variables para la determinación específica de lactulosa. Para ello, se realizaron varios ensayos utilizando diferentes concentraciones del patrón de lactulosa (1,0, 5,0 y 8,0 mg/mL) y a determinadas condiciones de laboratorio, se observó que la falta de refrigeración durante la preparación de la mezcla de

reacción y la excesiva temperatura del baño en ebullición (98-97°C), formaban complejos de color diferente (verde ó amarillo intenso) al color esperado (amarillo-naranja) por la presencia de cetohechosas⁴⁰, y por consiguiente, se observó un desplazamiento de la longitud de onda que se esperaba hallar (427 nm). A continuación, en la figura 15, se presentan algunos espectros que representan estos resultados inesperados.

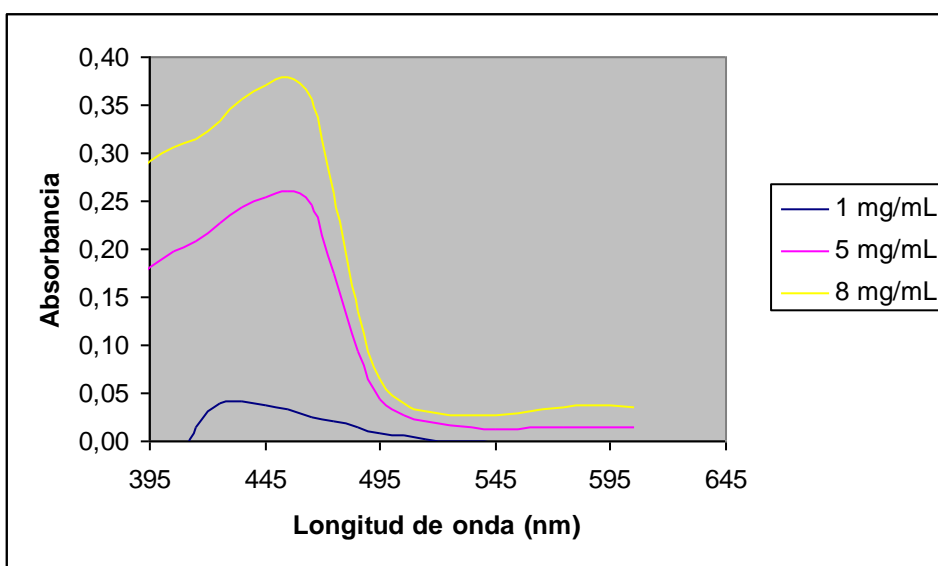


Figura 15. Desplazamiento de longitud de onda de la especie absorbente

Una vez completado el procedimiento con el baño de agua fría durante la preparación de la mezcla y optimizada la temperatura del baño en ebullición (94 °C), se consiguió la formación de un color amarillo-naranja que absorbía alrededor de los 427 nm teóricos. Adicional a esto, se tomó la precaución de emplear la antrona recién preparada y proteger de la luz la mezcla de reacción.

5.8 APLICACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTULOSA EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIALES

Una vez puesto a punto el método analítico, se determinó la concentración de lactulosa en muestras de leche UHT comerciales. El contenido de este indicador de calidad en cada una de las muestras analizadas, se expone en la tabla 27.

Tabla 27. Contenido de lactulosa (mg/mL) de leches líquidas ultrapasteurizadas (UHT). Equipo THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100

MUESTRA DE LECHE	THERMO GENESYS 6	INTRALAB DMS-100
	LACTULOSA (mg/mL)	
LECHES ENTERAS		
ALE	1,7	1,1
CEV	1,3	0,9
PEFeV	1,7	1,3
LECHES SEMIDESCREMADAS		
PS	0,7 ^a	0,5 ^a
PSOV	1,1	0,7
CSV	1,6	1,7
SFS	1,1	0,7
ApSV	1,5	1,3
ApSCaV	1,9	1,8
ApSMV	3,2	3,1
PSD	0,9	0,7
SFSD	1,1	0,9
ApSD	0,9	0,7
AISDF	0,9	0,7
CSDV	0,7 ^a	0,5 ^a
LECHES DESCREMADAS		
ApDF	6,8	7,2
CDV	1,1	0,7
ApD	0,9	0,7
AIDF	1,9	1,1
PDD	0,9	0,5 ^a
ApDD	0,9	0,7

^a Esta concentración fue calculada con base a la curva de calibración plantada en este estudio, pero debe considerarse como no confiable ya que corresponde a la mínima concentración de la curva, que se encuentra por debajo del límite de cuantificación del método.

Como se observa en la tabla 26, en todas las 21 muestras de leche UHT comerciales analizadas, el contenido de lactulosa varió considerablemente dentro de un amplio rango desde 0,7 a 6,8 mg/mL en el espectrofotómetro THERMO GENESYS 6 y de 0,5 a 7,2 mg/mL en el espectrofotómetro INTRALAB DMS-100, presento en este último equipo, valores bajos de concentración que el espectrofotómetro THERMO GENESYS 6. Esta variación dentro de los respectivos rangos, puede deberse a las diferentes condiciones de los procedimientos a los cuales están sujetas las leches en las diferentes industrias.

Observando la tabla 26, puede notarse que de las concentraciones de lactulosa de las muestras comerciales analizadas ninguna fue afectada por el contenido de la grasa, el cual vario en un rango de 0,00 a 3,50 %, según la caracterización físico-química realizada con anterioridad (sección 5.3). Este resultado concuerda con los estudios previos (Berg, 1993; Andrews, 1984; Geir y Klostermeyer, 1983)⁶, realizados a leches calentadas a una temperatura de 110-150 °C (U.H.T indirecto) y con diferente contenido de grasa, valores comprendidos entre 0,1, 1,5, 3,0, 4,2 ó 4,6 %, donde los resultados, no mostraron influencia significativa del contenido de grasa sobre las reacciones de degradación de lactosa^{6, 44}. Para este trabajo el análisis estadístico reporta que no existe diferencia significativa entre el contenido de lactulosa y el contenido de grasa en las leches analizada ($p = 0,117$ en THERMO GENESYS 6 y $p = 0,194$ en INTRALAB DMS-100, Anexo II).

Un factor que afecta la formación de lactulosa, es la concentración de lactosa presente en la leche²⁷, ya que una reducción de este sustrato, limita la reacción de degradación del mismo, implicando una menor formación de lactulosa. Este hecho es claramente observado en la tabla 26, donde las leches deslactosadas (independientemente del contenido de grasa), sometidas a procesos especiales para transformar la lactosa en unidades monoméricas, por acción de la enzima Lactasa, presentaron una menor concentración de lactulosa con respecto a las leches cuyo contenido de lactosa está alrededor de 9,36 a 10,0 g (Anexo I).

Sin embargo, para este caso, el aspecto relevante es el tratamiento térmico al que se sometió la leche, es decir la Ultrapasteurización a 132 °C durante 2 a 4 s, debido a que la formación de lactulosa procedente de la isomerización de lactosa, toma lugar por efecto del tratamiento térmico al que es sometida la leche.

Otros factores que afectan la reacción de isomerización de la lactosa son el pH y la concentración de fosfatos, pero es importante resaltar la relación entre ellos, antes de aclarar su efecto sobre la formación de lactulosa. La adición de fosfatos a la

leche aumenta el contenido de lactulosa, pero este efecto es atribuido en realidad al pH, ya que este también aumenta con la adición de fosfatos, catalizando así la reacción de isomerización de la lactosa²⁷.

En la fortificación de leches con materias salinas, la adición de fosfatos juega un papel muy importante en la estabilidad de la leche, principalmente en las caseínas, ya que ésta se ve afectada por la presencia de cationes como el calcio^{4, 39}. Esta razón sería óptima para justificar el alto contenido de lactulosa (3,2 y 3,1 mg/mL) en la muestra ApSMV, pues se ha enriquecido con este catión, sin embargo el valor de pH que presenta (6,602) no es considerado alto para provocar un aumento de la reacción de isomerización, lo cual lleva a descartarla y considerar la influencia del enriquecimiento con hierro, ya que generalmente la fortificación con sales férricas (ortofosfato férrico, pirofosfato sódico-férrico) requiere que se aumente alrededor de 10 °C, la temperatura de calentamiento, para inactivar la enzima lipasa, protegiéndola de su desnaturalización térmica⁴. Este aumento en la temperatura de pasteurización, sí implicaría la mayor formación de lactulosa en la muestra ApSMV, al igual que en las muestras PEFéV y ApSCaV, también enriquecidas con hierro (Anexo I) y cuyos contenidos en lactulosa, también presentan porcentajes relativamente altos (1,7 y 1,9 mg/mL respectivamente en el equipo THERMO GENESYS 6, y 1,3 y 1,8 mg/mL respectivamente en el equipo INTRALAB DMS-100).

La influencia del contenido de proteína sobre las reacciones de degradación de la lactosa, también han sido objeto de estudio. Para leches tratadas a una temperatura de 120 y 130 °C, no se estableció influencia de estas sobre la formación de lactulosa, mientras que a 140 y 145 °C fue notorio un fuerte efecto, siendo la formación de lactulosa más alta a más baja concentración de proteínas⁶.

Teniendo en cuenta este efecto relacionado con la temperatura y el hecho de que la lactulosa puede formarse por acción del calor como lactulosa libre o como

glicosilamina⁶, en esta oportunidad se considera favorecida la formación de lactulosa libre, puesto que la condensación con los grupos ϵ -amino de residuos de la lisina es factiblemente muy baja, debido al poco porcentaje de proteína presentado a nivel general en las muestras de leche analizadas (sección 5.3).

La muestra ApDF que presentó mayor contenido de lactulosa (6,8 y 7,2 mg/mL, respectivamente en cada equipo), es una leche adicionada con fibra soluble (pectina no viscosa ó carboximetilcelulosa, CMC). Normalmente las fibras adicionadas a la leche generan viscosidad en ella y están constituidas principalmente por monosacáridos como la glucosa, que podrían estar interactuando con las proteínas y favorecer la formación de lactulosa libre. Adicionalmente, esta leche presenta, según la información nutricional de su etiqueta, la mayor cantidad de lactosa con respecto a las demás leches.

A nivel general, los niveles de lactulosa encontrados en las muestras de leche analizadas, permitieron deducir que los tratamientos térmicos utilizados en nuestro país son más enérgicos de lo que teóricamente se esperaría en comparación con los niveles establecidos por la comunidad Europea. Esto es posible no solo por la alta tecnología desarrollada en dichos países para todo el proceso de tratamiento de leche incluyendo cuidado de ganado, ordeño, manipulación, transporte, entre otros, sino también porque precisamente estos procedimientos en Colombia podrían estar careciendo de un control de calidad.

En la tabla 28, se presenta una relación de los niveles encontrados en diferentes estudios, incluyendo las condiciones térmicas del tratamiento y evidenciándose la tendencia que muestra el tratamiento térmico de la leche UHT en Colombia, al presentar una mayor severidad que otros.

Tabla 28. Niveles de lactulosa encontrados en leches UHT y esterilizada en diferentes estudios

ESTUDIO	Lactulosa (mg/mL) LECHE UHT	Lactulosa (mg/mL) LECHE ESTERILIZADA	TÉCNICA DE ANÁLISIS	TRATAMIENTO Y TEMPERATURA UHT	TRATAMIENTO Y TEMPERATURA ESTERILIZACIÓN
UAI	0,5-1,8	----	Espectrofotometría	132 °C de 2-4 s	----
ANDREWS ²⁷	0,15-0,72	0,69-1,20	Enzimático	No reportado	No reportado
BELGA ¹⁹	<0,6	0,6	Test (BM) Roche-Boehringer Mannheim	135 °C a 1 s	130-140 °C 110-120 °C de 10 a 20 min
MADRID ⁴⁵	0,31-0,57	0,78-1,84	CG	No reportado	No reportado
	0,27-0,46	0,72-1,88	CLAR	No reportado	No reportado

Posiblemente, la severidad de los tratamientos térmicos a los que se somete la leche en Colombia, se deba a la baja calidad microbiológica de la leche cruda adquirida como materia prima para el procesamiento, lo cual resulta menor en comparación con leches españolas y europeas. Por tanto, una elevada carga microbiana implicaría que las leches fueran sometidas a un tratamiento térmico cercano o igual a las condiciones de esterilización, y esto estaría corroborando el menor porcentaje proteico (sección 5.3) encontrado en todas las leches respecto al que en teoría cabría esperar. De igual manera, podría atribuirse a este hecho la pérdida de vitaminas y otros componentes, y por consiguiente la creciente necesidad de la industria láctea por elaborar constantemente leches fortificadas y adicionadas en la actualidad.

Por otra parte, es posible observar que la adición de vitaminas, no muestra mucha influencia en el contenido de lactulosa calculado, debido a que en la mayoría de los casos, las vitaminas adicionadas son liposolubles (A, D y E) y constan de una estructura química básica formada por la condensación de moléculas de isopreno que se encuentran interaccionando con la fase lipídica y vitaminas hidrosolubles,

constituidas por anillos heterocíclicos, cuyas estructuras no están involucradas con las reacciones de degradación de la lactosa⁴.

Con base en todo lo anterior, se puede afirmar que en el contenido de lactulosa, influye la intensidad del tratamiento térmico, así como, el contenido de lactosa; de ahí, la importancia de calificar a la lactulosa como un índice válido para diferenciar entre leches según el tratamiento térmico aplicado y como una medida de control de los daños causados por dicho tratamiento.

Considerando los altos niveles de lactulosa obtenidos en las muestras de leche analizadas, podría pensarse en un efecto tóxico o de otra índole en el momento de consumir la leche UHT, puesto que se han reportado algunos desordenes gastrointestinales con dosis superiores a los 13 g diarios²⁷, pero realmente no se genera un efecto adverso; por el contrario, su incorporación medicada con una dosis de 20 a 40 g diarios a la dieta, origina cambios beneficiosos en el organismo.

Dentro de estos cambios y el principal de ellos, es estimular la proliferación de Bífido bacterias (bacterias probióticas) y a su vez disminuir las bacterias putrefactivas y potenciales patógenos³¹. Esto es posible debido a la baja absorción de lactulosa en el intestino humano, lo cual le permite llegar al colon y servir de fuente de energía para las Bífido bacterias, que al asimilarla originan ácidos grasos de cadena corta, que a su vez descienden el pH inhibiendo la proliferación de E. Coli, Bacteroides y Clostridios (bacterias patógenas)^{27, 31}.

Estas variaciones son el fundamento de varias aplicaciones clínicas de lactulosa, tales como tratamiento del estreñimiento, de la encefalopatía hepática, tratamiento de infecciones y trastornos inflamatorios del intestino, entre otras; así como también se aplica en la fortificación de fórmulas lácteas para bebés, ya que al no ser alimentados con leche materna disminuyen los niveles de Bífido bacterias³¹. Por tanto al ser estas quienes deben predominar en la flora intestinal del bebé se

hace indispensable incluir este carbohidrato en las dietas infantiles para inducir a un aumento de Bífido bacterias en el intestino y así evitar consecuencias desfavorables para la salud³¹.

6. CONCLUSIONES

- La caracterización preliminar de la composición de la leche líquida analizada, permitió calificarla como una leche apta para el consumo humano, debido a los rangos establecidos por la legislación.
- Dentro de la caracterización de la composición de la leche, la mayor variabilidad respecto a un valor teórico esperado lo presenta el porcentaje de proteína, que se encuentra por debajo de lo estipulado, permitiendo deducir que la carga de calor aplicada en el procesado de la leche está afectando su valor nutritivo.
- El haber realizado un ejercicio de intercalibración con otro laboratorio no solo genera un nivel de confianza para la metodología implementada en la caracterización de la composición físico-química de la leche, sino también permite conocer algunas falencias o virtudes que están pasando inadvertidas en la industria láctea y que pueden afectar de alguna manera al consumidor del producto.
- Fue posible evaluar el contenido de lactulosa en leches líquidas tratadas térmicamente (UHT), dado que en la normatividad Colombiana nunca antes se había tomado como parámetro de calidad de la leche.

- La aplicación del método analítico demostró ser una alternativa viable para la determinación de lactulosa a partir de 0,1 mg/mL, ya que optimizadas las condiciones experimentales y la técnica espectrofotométrica, fue posible obtener parámetros analíticos que confirmaron la confiabilidad de los resultados obtenidos.
- La viabilidad del método analítico representa para la industria, un procedimiento de fácil acceso, debido a los costos y sencillez de la técnica.
- El nivel de lactulosa encontrado en las diferentes leches U.H.T, supera los niveles establecidos para este tipo de leche en diferentes estudios realizados con anterioridad.
- La severidad del tratamiento térmico es, posiblemente, una consecuencia de la alta carga microbiana presente en la leche cruda, lo cual, hace que requiera de un tratamiento térmico más drástico al que en teoría puede esperarse.
- La severidad del tratamiento térmico, es corroborada con el bajo contenido de proteína, la cual puede desnaturalizarse por efecto del calor.
- El bajo nivel de proteína pudo corroborarse con la información nutricional, donde las leches que han sufrido procesos de industrialización para enriquecimiento con diferentes minerales, reportan niveles de proteína inferiores al establecido por la normatividad y similares a los obtenidos experimentalmente.
- Las considerables concentraciones que presentaron las muestras ApSMV, PEFev, ApSCaV y ApDF, se atribuye respectivamente al aumento de temperatura en el proceso de higienización para favorecer el

- enriquecimiento con hierro y a la posible interacción proteínas-monosacáridos de la fibra, que beneficia la formación de lactulosa libre.
- El contenido de lactulosa no se ve afectado por el contenido de grasa que tenga la leche, pero sí por el bajo contenido de lactosa.
- La muestra ApDF con mayor contenido de lactulosa, presenta según la información nutricional de su etiqueta, la mayor cantidad de lactosa con respecto a las demás leches.

RECOMENDACIONES

- Para obtener resultados confiables con este método, es importante tener cuidado con la estabilización de la temperatura de calentamiento en el baño de agua que debe estar a 94 °C, así como asegurar que la mezcla de reacción no reciba calentamiento adicional antes de llevarla al baño de agua en ebullición, realizando la mezcla dentro de un baño de agua fría.
- La manipulación del reactivo antrona es indispensable para el desarrollo del proceso. Este debe ser almacenado en un vial de vidrio ámbar para no ser afectado por la luz y debe ser herméticamente sellado para evitar la absorción de humedad. En todos los casos, la antrona debe utilizarse recién preparada.
- Continuar con la optimización de condiciones que contribuyan al mejoramiento del método aplicado y/o buscar, implementar otros métodos como cromatografía de gases, ya que éste es el método más ampliamente utilizado en la determinación de lactulosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. POTTER, N y HOTCHKISS, J. Ciencia de los alimentos. Zaragoza (España): Editorial Acriba, S.A, 1991. p. 270-273, 310-311
2. GALARRAGA, A y ROCANDIO, P. Leches bajas en lactosa. Utilidad dietético-sanitaria e indicaciones. Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos. Vol 285. 1997. p. 51
3. NORMAS Y PROCEDIMIENTOS REGLAMENTARIOS DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. Ministerio de Salud. Capitulo IV. De la clasificación de las leches. Decreto Nº 2437 30 de Agosto de 1983. Capitulo I. Disposiciones generales y definiciones. Decreto Nº 476 10 de Marzo de 1998
4. BADUI, S. Química de los alimentos. México: Alhambra Mexicana, 1981. p. 135, 140-142, 376, 395, 397
5. JIMENEZ, S. Indicadores del deterioro de la leche. (2002:Madrid). Conferencia pronunciada En: Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España. [Citado 13 Febrero, 2002].
6. BERG, H. Reactions of Lactose during heat treatment of milk: A quantitative Study. Wageningen, 1993. Ph.D. thesis. Agricultural University. p. 1-4, 9, 13-15, 100-120.
7. VILLAMIEL, M; ARIAS. M; CORZO, N. y OLANO, A. Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milks. Zeitschrift für lebensmitteluntersuchung Unters Forschung A. Vol 208. 1999. p. 169-171
8. GROSCH, W y BELITZ, H. Química de los alimentos. Zaragoza (España): Editorial Acriba, S.A, 1997. p. 537-559
9. CHEFTEL, J y CHEFTEL, H. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Zaragoza (España): Editorial Acriba, S.A, 2000. p. 50
10. ALMANZA, F y BARRERA, E. Tecnología de leches y derivados. Santa fe de Bogotá, D.C.:Unisur, Unidad Universitaria del Sur de Bogotá, 1995. p. 3, 18
11. KIRK, R; SAWYER, R y EGAN, H. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. México: Compañía Editorial Continental S.A de C.V, 1996. p. 584-585, 606-608

12. FENEMA, O. Química de los alimentos. Zaragoza (España): Editorial Acriba, 1993. p. 894-901, 925
13. VARNAM, A y SUTHERLAND, J. Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Zaragoza (España): Editorial Acriba, S.A, 1995. p. 12
14. RIVERA, J. Tecnología de leche y derivados. San Juan de Pasto: Editorial Universitaria Universidad de Nariño, 1995. p. 63
15. VANACLOCHA, A. y REQUENA, J. Procesos de conservación de alimentos. España: Ediciones Mundi-Prensa, 1999. p. 135-138
16. LA COMESTABILIDAD DE LOS ALIMENTOS IRRADIADOS. (659:1981:Ginebra). Informe de Comité Mixto FAO/OIEA/OMS. Ginebra: FAO y OMS, 1981
17. DECRETO 616. Ministerio de la Protección Social. Capítulo I. Definiciones. 28 de Febrero de 2006.
18. LOZANO, R. Composición y propiedades de la leche. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencia y tecnología de alimentos. Bogotá (Colombia), 1998
19. MORTIER, L; BRAEKMAN, A; CARTUYVELS, D; VAN RENTERGHEN, R y DE BLOCK, J. Intrinsic Indicators for monitoring heat damage of consumption milk. Biotechnology Agronomy Society Environment. Vol 4. 2000. p. 221-225.
20. CORZO, N; DELGADO, T; TROYANO, E y OLANO, A. Ratio of lactulosa to furosine as indicator of quality of comercial milks. Journal of Food Protection. Vol 57. 1994. p. 737-739.
21. LUZZANA, M; AGNELLINI, D; CREMONESI, P; CARAMENTI, G y VITA, S. Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. Lait. Vol 83. 2003. p. 409-416
22. KULMYRZAEV, A. y DUFOUR, E. Determination of lactulosa and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. Lait. Vol 82. 2002. p. 725-735.
23. MARCONI, E; MESSIA, M; AMINE, A; MOSCONE, D; VERNAZZA, F; STOCCHI, F y PALLESCI, G. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulosa assay. Food Chemistry. Vol 84. 2004. p. 447-450.

24. ADHIKARI, AK; SAHAI, D y MATHUR, O. A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in heated milk and milk products. *Lait*. Vol 71. 1991. p. 555-564.
25. BERG, H. y VAN BOEKEL, M.; Degradation of lactose during heating of milk. *Netherlands Milk & Dairy Journal* Vol 48. 1994 p. 157-175
26. ADACHI, S y PATTON, S. Presence and significance of lactulose in milk products. *Journal of dairy Science*. Vol 44. 1961. p. 1375-1393
27. GEOFFREY, A. Formation and occurrence of lactulose in heated milk. *Journal of Dairy Research*. Vol 53. 1986. p. 665-680.
28. BLOCK, J; MERCHERS M; RENTERGHEM, R y MOERMANS R. Evaluation of two methods for the determination of lactulosa in milk. *International Dairy Journal*. Vol 6. 1996. p. 217-222
29. OLANO, A y MARTINEZ, I. *Handbook of food analysis*. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1692-1694.
30. MARTINEZ CASTRO, I. y CALVO, M. Chromatographic Determination of Lactulose. *Chromatographia* Vol. 23 1987. p. 132-136
31. OLANO, A. La lactulosa, un carbohidrato singular. (2000:Madrid). Conferencia pronunciada En: *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España*. [Citado 22 Noviembre 2000].
32. INDYK, H; EDWARDS, M y WOOLLARD, D. High performance liquid chromatographic analysis of lactose-hydrolysed milk. *Food Chemistry*, Vol 57. 1996. p. 575-580
33. NAGENDRA, R. y VENKAT, S. An improved colorimetric method for the estimation of lactulose in lactose-lactulose mixtures. *Food Chemistry*. Vol 43, 1992 p. 399-402
34. AOAC. (2003) Vol II, *Food Composition; Additives; Natural Contaminants*. Capitulo 33. Dairy Products. Method 925.22. Specific Gravity of Milk. Method 947.05. Acidity of Milk. Method 925.23. Solids (Total) in Milk. Method 945.46. Ash of Milk. Method 991.20. Nitrogen (Total) in Milk. Method 2000.18. Fat Content of Raw and Pasteurized Whole Milk. Gerber Method by Weight. En: *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17 th edition*. Published by AOAC INTERNATIONAL, William Horwitz, USA. p. 5, 7, 10-11, 21-22A

35. QUATTROCCHI, O; ABELAIRA, S; LABA, R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires (Argentina): Artes gráficas Farro S.A, 1992. p. 302-323.
36. MASCONI, O; BERNARO, R; MARCONI, E; PALLESCHI, A y PALLESCHI, G. Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors. The Analyst. Vol. 124. 1999. p. 325-329
37. COZO, N; OLANO, A y MARTINEZ, I. Diferenciación de leches sometidas a distintos tratamientos térmicos mediante el análisis de la composición en disacáridos libres por cromatografía de gases. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Vol. 26, 1986. p.565-570
38. SKOOG, D; HOLLER, F y NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. España: McGraw Hill, 2001. p. 353-376
39. VENTANAS, J. Lactología Técnica: Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. España: Editorial Acriba, 1980. p.11
40. ALEMANY, M y FONT, S. Prácticas de Bioquímica. España: Editorial Alambra, 1983. p. 79,81,92-93
41. OLANO, A. Solubility of lactose and lactulose in alcohols. Journal of Food Science and Technology. Vol. 16. 1979. p. 260-261
42. FURNESS, B; HANNAFORD, A; SMITH, P y TATCHELL, A. Vogel's. Text book of practical organic chemistry. London: Longman Scientific & Technical, 1989. p. 383-393, 1032
43. SILVERSTEIN, R; BASSLER, G y MORRILL, T. Spectrometric identification of organic compounds. Singapore: John Wiley & Sons, 1981. p. 310-329
44. GEIER, H y KLOSTERMEYER, H. Formation of lactulose during heat treatment of milk. Milchwissenschaft. Vol. 38, 1983. p.475-477
45. CALVO, M; KLETT, S; SANTOS, M y OLANO, A. Estudio Comparativo de la determinación de lactulosa en leches mediante Cromatografía de Gases y Cromatografía de líquidos de alta resolución. Revista Española de lechería. Vol. 130, 1989. p.261-264.

ANEXOS

ANEXO I. Componentes mayoritarios y minoritarios de las muestras de leche según el envase.

ANEXO II. Análisis estadístico.

Anexo III. Protocolos de los análisis físico-químicos de la Unidad de Análisis Industriales.

ANEXO I

Tabla 29. Componentes mayoritarios de las muestras de leche según el envase

LECHE	INFORMACIÓN NUTRICIONAL (Tamaño porción 200 mL)								
	CALORÍAS (cal)	CARBOHIDRATOS (g)		PROTEÍNAS (g)	GRASA				FIBRA DIETARIA (g)
		Totales	Azúcar (lactosa)		Total (g)	Saturada (g)	Colesterol (mg)	Ácido graso (mg)	
ALE	128,0	10,0	10,0	6,0	7,0	5,0	30,0		0
CEV	119,9	10,0		6,0	6,0	4,0	28,0		
PEFeV	118,2	9,6		6,0	6,2				
PS	90,20	9,8		6,0	3,0				
PSOV	94,0	9,6		6,4	3,4	1,8		320	
CSV	100,0	10,0		6,0	4,0	2,0	16,0		0
SFS	94,0	9,4		6,2	3,4				
ApSV	80,0	9,6	9,6	5,6	3,0	1,6	12,0		
ApSCaV	80,0	9,6	9,6	5,6	3,0	1,6	12,0		
ApSMV	90,0	11,0		5,4	3,0	2,0	12,0		
PSD	91,0	9,8	0,48	6,2	3,0				
SFSD	92,0	9,4		5,9	3,4				
ApSD	80,0	9,6	1,4	5,6	3,0	1,6	12,0		
AISDF	92,0	10,0		6,0	3,0	2,0	15,0		<1
CSDV	95,9	10,0	0	6,0	4,0	2,0	15,0		
ApDF	72,0	12,8	10,4	6,2	0,8	0,08	0,0		2,48
CDV	71,9	10,0		6,0	1,0	0,0	4,0		
ApD	56,0	9,36	9,36	5,36	0,0	0,0	0,0		
AIDF	67,0	10,0		6,0	0,0	0,0	0,0		<1
PDD	65,8	9,8	0,48	6,2	0,20				
ApDD	56,0	9,36	1,4	5,36	0,0	0,0	0,0		

Tabla 30. Componentes minoritarios de las muestras de leche según el envase

LECHE	INFORMACIÓN NUTRICIONAL (Tamaño porción 200 mL)																	
	MINERALES						VITAMINAS											
	Na (mg)	Ca (%)	Fe (%)	P (%)	Zn (%)	Totales (g)	A (%)	D (%)	C (%)	E (%)	B ₁ (%)	B ₂ (%)	B ₆ (%)	B ₁₂ (%)	ÁCIDO FOLICO (%)	NIACINA (%)	BIOTINA (%)	
ALE	96	48,0	1				4,0	40,0	0,0									
CEV	100	25,0	1				20,0	25,0			22,0	16,0						
PEFeV		0,12	0,48				0,078	0,001			0,06	0,08	0,13		20,0	1,0	9,0	
PS		0,12				1,22	0,075	0,001										
PSOV		0,12							20,0	3,0			0,6					
CSV	100	25,0	1				10,0	20,0										
SFS		0,11		88,0		1,40						0,16		0,4				
ApSV	76	28,0		16,0			12,0	12,0										
ApSCaV	76	62,4		35,0			12,0	12,0										
ApSMV	95	35,0	20,0	25,0	35		17,5	50,0	12,5	15,0	15,0	25,0	15,0	50,0	27,5	12,5	50,0	
PSD*		0,12				1,20												
SFSD*		0,12				1,40												
ApSD*	76	28,0		16,0														
AISDF*	97	48,0	1				2,0	20,0	0,0									
CSDV*	100	22,0	1				25,0	25,0			26,0	16,0						
ApDF		48,0		16,8			24,0	42,4										
CDV	80	25,0	1				20,0	24,0			22,0	16,0						6,2
ApD	104	24,0		20,0			12,0	12,0										
AIDF	96	48,0	1				0,0	0,0	0,0									
PDD*		0,12				1,20												
ApDD*	76	24,0		20,0			12,0	12,0										

*Enzima Lactasa

ANEXO II
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INTERCALIBRACIÓN DE LOS ANALISIS FISICO-QUÍMICOS

**PRUEBA t PARA COMPARACION DE UNA MEDIA EXPERIMENTAL
 CON UN VALOR CONOCIDO - CONTRASTE BILATERAL**

LECHE ENTERA - CRUDA

	\bar{x}	VALOR CONOCIDO	$\sqrt{10}$	S	t _{calculada}	t ₉ (p=0,05)	Diferencia Significativa
Desidad	1,0310	1,0300	3,162	0,0002	15,810	2,262	SI
Acidez	0,133	0,138		0,002	7,905		SI
p H	6,697	6,630		0,004	52,964		SI
Grasa	3,73	3,70		0,06	1,581		NO
ES	12,36	12,08		0,07	12,648		SI
ESD	8,63	8,38		0,12	6,588		SI

LECHE ENTERA - PASTEURIZADA

	\bar{x}	VALOR CONOCIDO	$\sqrt{10}$	S	t _{calculada}	t ₉ (p=0,05)	Diferencia Significativa
Desidad	1,0320	1,0305	3,162	0,0006	7,905	2,262	SI
Acidez	0,176	0,154		0,004	17,391		SI
p H	6,597	6,600		0,004	2,371		SI
Grasa	3,02	3,20		0,07	8,131		SI
ES	11,66	11,61		0,14	1,129		NO
ESD	8,65	8,41		0,11	6,899		SI

LECHE ENTERA - UHT

	\bar{x}	VALOR CONOCIDO	$\sqrt{10}$	S	t _{calculada}	t ₉ (p=0,05)	Diferencia Significativa
Desidad	1,0310	1,0310	3,162	0,0002	0,000	2,262	NO
Acidez	0,133	0,136		0,001	9,486		SI
p H	6,780	6,760		0,002	31,62		SI
Grasa	3,29	3,30		0,21	0,151		NO
ES	11,81	11,85		0,26	0,486		NO
ESD	8,52	8,55		0,07	1,355		NO

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DE LA LACTULOSA,
USANDO LOS EQUIPOS THERMO GENESYS 6 e INTRALAB - DMS 100**

PRUEBA t PARA COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS EXPERIMENTALES

	$\bar{X} 1$	$\bar{X} 2$	d	\bar{d}	Sd	n	tcalculada	t ₉ (p=0,05)	Diferencia Significativa
ApSCaV	0,007	0,007	0	0,0007	0,00048	10	0,1007	2,26	NO
	0,007	0,006	0,001						
	0,007	0,006	0,001						
	0,007	0,006	0,001						
	0,007	0,006	0,001						
	0,006	0,006	0						
	0,006	0,006	0						
	0,007	0,006	0,001						
	0,007	0,006	0,001						
	0,007	0,006	0,001						

	$\bar{X} 1$	$\bar{X} 2$	d	\bar{d}	Sd	n	tcalculada	t ₉ (p=0,05)	Diferencia Significativa
0,1 mg/mL	0,003	0,005	-0,002	-0,001	0,00047	10	-0,1456	2,26	NO
	0,003	0,004	-0,001						
	0,003	0,004	-0,001						
	0,003	0,004	-0,001						
	0,003	0,004	-0,001						
	0,003	0,004	-0,001						
	0,003	0,004	-0,001						
	0,003	0,004	-0,001						
	0,004	0,004	0						
	0,003	0,004	-0,001						

	$\overline{X 1}$	$\overline{X 2}$	d	\overline{d}	Sd	n	tcalculada	t ₉ (p=0,05)	Diferencia Significativa
0,3 mg/mL	0,012	0,013	-0,001	-0,0003	0,00067	10	-0,0365	2,26	NO
	0,011	0,012	-0,001						
	0,012	0,012	0						
	0,013	0,013	0						
	0,012	0,011	0,001						
	0,012	0,013	-0,001						
	0,012	0,012	0						
	0,011	0,012	-0,001						
	0,011	0,011	0						
	0,012	0,012	0						

ANÁLISIS DE SIGNIFICANCIA PARA CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE LA LACTULOSA EN LECHEs UHT, USANDO LOS EQUIPOS THERMO GENESYS 6 e INTRALAB – DMS 100

NOTA: inicialmente se realizó un análisis de varianza ANOVA, complementada con una prueba de comparaciones múltiples de Duncan, para la caracterización y análisis de lactulosa en leches comerciales UHT; sin embargo, no fue lo suficientemente puntual, debido al tamaño de muestra y la amplitud del rango que emplea la prueba. Por tanto, se realizó una segunda prueba no paramétrica de Krukal Wallis que permitió la puntualización de las diferencias existentes entre las leches de cada grupo (enteras, semidescremadas y descremadas)

PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS DE KRUSKAL-WALLIS

LECHES ENTERAS

Estadísticos de contraste^{a,b}

	DENSIDAD	ACIDEZ	pH	GRASA	EXTRACTO SECO	EXTRACTO O SECO DESENGRASADO	PROTEÍNA	CENIZA	LACTULOSA EN GENESYS	LACTULOSA EN DMS
Chi-cuadrado	8,000	7,385	7,385	7,385	6,655	7,385	5,969	2,895	8,000	8,000
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,018	,025	,025	,025	,036	,025	,051	,235	,018	,018

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: CODIGO

LECHES SEMIDESCREMADAS

Estadísticos de contraste^{a,b}

	DENSIDAD	ACIDEZ	pH	GRASA	EXTRACTO SECO	EXTRACTO O SECO DESENGRASADO	PROTEINA	CENIZA	LACTULOSA EN GENESYS	LACTULOSA EN DMS
Chi-cuadrado	35,000	34,180	34,493	31,505	33,100	33,334	25,652	23,718	34,944	34,868
gl	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Sig. asintót.	,000	,000	,000	,001	,001	,000	,007	,014	,000	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: CODIGO

LECHES DESCREMADAS

Estadísticos de contraste^{a,b}

	DENSIDAD	ACIDEZ	pH	GRASA	EXTRACTO SECO	EXTRACTO O SECO DESENGRASADO	PROTEINA	CENIZA	LACTULOSA EN GENESYS	LACTULOSA EN DMS
Chi-cuadrado	14,478	15,256	16,266	17,000	16,134	15,051	13,389	13,230	16,919	16,939
gl	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sig. asintót.	,013	,009	,006	,004	,006	,010	,020	,021	,005	,005

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: CODIGO