01H. 12241
F29
II

42506

CENTRO REGIONAL DE ESTUDIOS AVANZADOS

Manual de Procedimientos del Laboratorio de Lactología

"Análisis Físico-Químicos"

CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES
BIBLIOTECA
Dr. Mario Bergara

Manual de procedimientos - Lactología

Prefacio

La calidad de la leche continúa siendo unos de los puntos más débiles, dentro del conjunto de factores que determinan la calidad de los quesos, especialmente en los países en desarrollo, de tradición lechera caprina y ovina incipiente. En la Provincia existe un gran incentivo a la producción de este tipo de leche y además se trabaja exhaustivamente por una producción lechera de excelente calidad.

A partir de la situación planteada se verá la importancia del conocimiento de la leche y de los efectos que podrá causar en la fabricación de quesos.

Como es de amplio conocimiento, diversos factores intrínsecos (ej. raza) extrínsecos (clima) producen variaciones en la materia prima (alimento, pasturas), afectando principalmente la composición química de la leche.

El análisis físico- químico de leche tiene por objetivo determinar su genuinidad y su estado higiénico dada su importancia como alimento.

Sin embargo es interesante comprender que el conocimiento de la composición de la leche reviste importancia capital para su transformación en productos lácteos. El rendimiento en la fabricación de un determinado producto lácteo, depende en un 79% de la composición química de la leche

La composición cualitativa y cuantitativa de la leches de cabra, oveja y vaca varía en función de diversos factores tales como el nivel de producción, raza, alimentación, el estado sanitario del animal.

Es, para este laboratorio, primordial realizar un control de calidad exhaustivo de las diferentes muestras, aplicando metodologías de acuerdo al **Método Oficial AOAC.** Por ello se decidió elaborar un manual de procedimiento que refleja las tareas y procedimientos cotidianos en el laboratorio.

Introducción

Este informe final intenta, no sólo realizar una recapitulación cuidadosa de las técnicas de análisis, sino también, realizar una selección a conciencia de los procedimientos que, a través del tiempo van sufriendo cambios y modificaciones debidas al desarrollo tecnológico en las técnicas de estudios y de análisis.

La leche, los quesos forman parte hasta tal punto de nuestra cultura que nos olvidamos hablar de ellos: se cree saber todo sobre este tema, aunque cada vez son mayores la cantidad de investigadores dedicados a realizar los trabajos de investigación en esta temática y que tratan de explicar y mejorar la calidad final del producto.

Este manual describe en forma general el plan de tareas a llevar a cabo en el laboratorio físico químico de Lactología. Pretende señalar cuales son los lineamientos que debe seguirse para cumplir con los mínimos requisitos necesarios que permite operar en el laboratorio cumpliendo con el control de calidad de leches.

El manual de procedimiento consta de dos etapas:

La primera etapa del manual describe los contenidos teóricos de la composición físico química de las leches y permite diferenciar las características fundamentales en sus propiedades. Además permite adquirir un conocimiento de la composición química.

La segunda etapa proporciona un enfoque sobre las metodologías y técnicas analíticas de acuerdo a los métodos Oficial de la AOAC.

INDICE

CAPITULO 1: **COMPOSICION Y PROPIEDADES FISICO- QUIMICAS**

1.1 Definición de leche.

1.2 Criterios organolépticos.

1.3 Principales constantes físicas

1.4 Acidez

1.5 Densidad

1.6 Viscosidad

1.7 Valor energético

1.8 Composición Química

1.9 Cenizas

1.10 Extracto seco o sólidos totales.

1.11 Materia grasa

1.12 Hidratos de carbono

1.13 Proteínas

1.14 Enzima

1.15 Proteínas del lactosuero

1.16 Minerales

CAPITULO 2. Factores causantes de variación en la composición química

2.1 Ligados al animal

2.2 Ligados a las condiciones de cría

2.3 Ligados al medio ambiente

CAPITULO 3: PROCEDIMIENTOS EN EL LABORATORIO

3.1 Toma de muestras

3.2 Preparación y conservación de la muestra de leche

3.3 Ensayos físicos

3.4 Ensayos químicos

CAPITULO 4: DETEMINACIÓN QUIMICA DE ELEMENTOS MINERALES EN LA LECHE.

4.1 Minerales y sales

4.2 Distribución de macroelementos

4.3 Distribución de oligoelementos

4.4 Transferencia de minerales en leche

4.5 Evolución de los equilibrios salinos

4.6 Determinaciones químicas de minerales

4.6.1 Determinación de Calcio

4.6.2 Determinación de Hierro

4.6.3 Determinación de minerales

CAPITULO 5 : OPERACIONES TRADICIONES EN EL LABORATORIO

CAPITULO 1: COMPOSICION Y PROPIEDADES FISICO- QUIMICAS

1.1 Definición de leche

La leche es el producto de secreción de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos elaborados para la nutrición de sus crías.

Es un producto de alta complejidad físico- química consiste en una emulsión perfecta natural de pequeñas gotas de grasa dispersas en un medio acuoso de lactosa y sales minerales en solución estabilizando esta emulsión, hay una tercera fase coloidal constituida por proteínas.

Desde el punto de vista nutritivo, es un alimento completo: grasa, proteínas, hidrâtos de carbono, minerales, vitaminas, agua, gases de la atmósfera y trazas de elementos que provienen de la sangre circulante(concentrado en las glándulas mamarias) conforman este producto.

Propiedades

Las propiedades de un producto biológico como lo es la leche, quedan definidas tanto por su composición como por su estructura física (Disposición espacial de sus componentes).

La composición química de la leche determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para fabricar alimentos y muchas de sus propiedades.

1.2 Criterios organolépticos

Color: Blanco mate. Contrariamente a la leche de vaca, la leche caprina no contiene beta caroteno.

Olor: Bastante neutro, aunque al final de la lactación aparece el olor cáprico.

Sabor: Dulzón, agradable.

Aspecto: Limpio, sin grumos.

1.3 ACIDEZ VALORABLE

La acidez se expresa en grados Dornic (un grado Dornic equivale a 0,1g. de ácido láctico por litro de leche), en el momento del ordeño, su valor oscila entre 12 °D y 14 °D. Esta acidez natural es función del período de lactación, ya que la concentración de caseínas, varía en las distintas etapas. La acidez natural depende del contenido de caseínas, sales minerales e iones.

La razón fundamental de la determinación de acidez es detectar leche acidificadas; da una medida del estado de conservación y condiciones sanitarias.

pH

La medida del pH nos da una información precisa del estado de frescura de la leche.

El pH de la mayoría de las leches oscila entre 6,6- 6,8, con una media aproximada de 6,7 a 20°C. El pH de la leche aumenta con la lactación del calostro puede llegar a 6,0 y el de la mayoría de las leches mastiticas alcanza 7,5.

La leche contiene varios grupos ácidos y básicos que le confieren actividad tampón:

RESTOS LIGADOS A PROTEÍNAS	SALES
ÁCIDO ASPARTICO	FOSFATO
ÁCIDO GLUTAMICO	CITRATO
HISTIDINA	ESTER FOSFATO
TIROSINA	ACIDOS CARBOXILICO
ESTER-FOSFATO	AMINAS
AC. N-ACETILNEURAMINICO	ACIDO LACTICO
GRUPOS TERMINALES	CARBONATO

Los grupos ionizables de las proteínas, los fosfatos y los citratos son los que en definitiva, determina la acidez.

La acidez titulable de la leche es el poder buffer de la leche entre su propio pH y el pH al que vira la fenoftaleína (8,3).

Por fermentación bacteriana puede producirse ácido láctico, a partir de lactosa y otros ácidos, acético degradación de citrato e hidrólisis de proteínas.

Por otra parte, procesos de lipolisis disminuyen el pH, aumentando la acidez titulable.

1.5 DENSIDAD

La densidad de leche de cabra oscila entre 1.026 y 1.042 en función de factores extrínsecos como la raza y las diferentes estaciones del año. Esta magnitud depende principalmente de dos factores: extracto seco y concentración de materia grasa.

IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE LA GRAVEDAD ESPECIFICA

La densidad, peso especifico (relación de pesos) o gravedad especifica (relación de masa) es variable tanto como es la composición de la leche. Los componentes solubles la aumentan, mientras que las grasas la disminuyen.

Si la **gravedad especifica es menor** que lo permitido, la leche está aguada (se diluyen los solutos).

Si la **gravedad especifica es mayor** que lo permitido, la leche ha sido descremada.

PUNTO DE CONGELACION

Esta determinación se realiza para la detección de aguado de la leche por Crioscopía, únicamente en leches frescas no acidificadas.

1.6 VISCOSIDAD

La viscosidad disminuye al aumentar la temperatura, se expresa en centipoises (cP). La misma es menor que la de vaca, siendo 1.186 cP para la cabra 1236 cP para leche de vaca.

1.7 VALOR ENERGETICO

El valor nutricional de la leche se puede estudiar desde dos fuentes de información: a partir de la composición FISICO- QUIMICA y la que proviene de la literatura médica pediátrica. Los estudios confirman un buen valor nutritivo de la leche de cabra siempre que sea producida en perfectas condiciones de higiene.

La fórmula de Gaines permite estimar el valor energético de la leche de cabra a partir de la composición de materia grasa:

Energia de la leche = 312,92 + 11,168 * concentración de grasa = tanto por mil

La composición de la leche varía significativamente, siendo leches ricas en grasas y proteínas, lo que se traduce en un mayor valor energético.

1.8 COMPOSICION QUIMICA

La composición cualitativa y cuantitativa de leche de cabra, varía en función de diversos factores como: nivel de producción, raza, alimentación y estado sanitario del animal, etc.

La siguiente tabla presenta resultados comparativos de composición media de leche de vaca y de cabra :

Componente	leche de vaca	leche de cabra
Grasa (%)	3,86	4,15
Proteínas (%)	3,22	3,50
Lactosa (%)	4,73	4,20
Ceniza(%)	0,72	0,82
Sólidos totales(%)	12,60	
sól. No grasos(%)	9,02	8,68
rel caseína / prot. Totales (%)	78	75,6
calcio mg/l	1,25	1,35
Fósforo (mg/l)	0,95	1,00
acidez (°D)	15-18	17-18
pH	6.65- 6.71	6,50-6,80

Globalmente la composición de la leche de cabra en lo que concierne a sus constituyentes mayores, es más rica que la de vaca, pero menos que la de oveja.

Sin embargo es importante situar la composición de la leche de acuerdo al nivel de la producción lechera. Incluso la producción y el tenor de materia grasa están a su vez afectados por la raza. Ver tabla 2

Raza	Mat. Grasa	Sol. no grasos	Ext. Seco total
Toggenburg	3,7%	8,4%	12,1%
Saanen	3,7%	8,3%	12,0%
Alpina	4,0%	8,5%	12,5%
Anglo-Nubian	4,6%	8,8%	13,4%

1.9 CENIZAS

Es el residuo que queda después de la incineración, que difiere en composición de las sales de la leche.

No necesariamente representan la composición original de la leche ya que durante la incineración se produce lo siguiente :

A) Se destruyen las sales orgánicas como los citratos (se determinan como bicarbonato)

B) El **S** proteico se oxida y en cenizas se determina como sulfato.

C) El fosfato esterificado en las caseínas y fosofolípidos se convierten en fósforo inórganico.

D) Las pérdidas de carbonato, en forma de CO_2 y las ganancias (por oxidación de compuestos orgánicos) cambian el contenido de $CO_3^{=}$.

Por volatilización se pierde algo de cloruros de sodio y potasio.

E) Se forman óxidos metálicos.

PROCEDIMIENTO

La incineración se realiza colocando una determinada cantidad de muestra en crisol de cuarzo, platino; primero se evapora al aire en baño de agua, luego se lleva a mufla a 550°C, para evitar proyecciones y volatilización de sales volátiles.

Una vez incinerada la muestra se coloca en desecador y se deja enfriar, luego se pesa. Esta operación se repite hasta obtener peso constante.

Las cenizas obtenidas deben estar exentas de puntos oscuros lo cual indicaría incineración deficiente. En tal caso, se disgregan las cenizas, se evaporan, incinerar, desecar, enfriar y pesar.

Si persistiera color, entonces se disuelven en agua, se filtra y el residuo se recoge sobre papel de filtro sin cenizas. Se incinera en cápsula, en ambiente de oxígeno.

Ahora, si esta operación no diera resultado, se agregará sustancias que faciliten la incineración como una (mezcla 1+1 glicerina- alcohol etílico 95 % vaselina, etc.) Estas sustancias tienen la propiedad de formar tortas porosas con la muestra de modo que el oxígeno penetre fácilmente, sin modificar la composición original de la muestra. Además volatilizan a la temperatura de incineración.

IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE CENIZAS

Permite evidenciar fraudes en caso de aguado el porcentaje de sólidos disminuye.

1.10 EXTRACTO SECO O SOLIDOS TOTALES

Es el residuo que queda posteriormente de la evaporación del agua y otras sustancias, en condiciones estandarizadas. Puede ser graso o no grasos. Existen dos métodos para determinarlos:

DIRECTO : Consiste en evaporar el agua, por desecación al horno, hasta peso constante.

Suele agregarse dispersantes (arena lavada, secada y calcinada) y ácido acético o formol, para evitar proyecciones.

Se calcula por diferencia de pesada antes y después de someter la muestra al calor.

INDIRECTO: Estima el extracto seco calculando la densidad y el contenido graso a partir de la relación:

%ES = 1,23%MG + 260 (d-100)/d = % peso(12,5)

En la práctica, el método directo presenta ciertos inconvenientes:

La leche desecada es muy higroscópica y la fracción final de agua es difícil de eliminar. Se mejora los resultados utilizando temperaturas de hasta 120°C y aire presecado.

El agua de cristalización de la lactosa es bastante persistente. Por ello, suele evaporarse a baño María la mayor parte del agua antes de la desecación al horno.

Los componentes volátiles distintos del agua suele eliminarse al desecar (oxígeno, ácidos grasos de cadena corta, amoníaco, etc.)

El calor favorece las reacciones químicas tipo Maillard que disminuyen el peso y oxidan la fracción lipídica con aumento de peso.

El residuo final deberá ser blanco o blanco amarillento. Si es muy oscuro, se ha quemado la lactosa hay pérdida incierta de agua.

El residuo no siempre representa fielmente la composición de la parte no acuosa de la leche. Por esta razón apelar a la forma indirecta, siendo fácilmente calculable la densidad y aún con bastante exactitud.

IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE SOLIDOS TOTALES.

La determinación de sólidos totales tiene valor de confirmar genuinidad y evidenciar fraudes.

Las especificaciones de muchos productos incluyen exigencias Standard mínimas asimismo, el rendimiento de los productos desecados dependen del extracto seco.

Dado que el valor de ES VARIABLE, es conveniente recurrir al dato de extracto seco no graso, que es más constante.

%ES no graso = % extracto seco - % materia grasa

Así es posible calcular grado de aguado y descremado:. Por ejemplo se determino extracto seco no graso = 75% ; materia grasa =2% ; SE PRETENDE ESTIMAR EL PORCENTAJE DE AGUADO DE ESA MISMA LECHE.

SI 8,2% (VALOR NORMAL).....100% PUREZA

7,0% (VALOR MEDIDO).....X = 90% PUREZA MUESTRA

LA DIFERENCIA(100%-90%)= 10% DE AGUADO

CALCULO DEL GRADO DE DESCREMADO

SI 3,0% (VALOR NORMAL).....100% PUREZA LECHE

2,8 %.....90% PUREZA MUESTRA

Este valor de MG= 2,8 % es tenor graso que debería tener la muestra para un 90% de pureza, según el cálculo a partir del dato de aguado.

En realidad, el valor de materia grasa medido fue de 2%. Entonces:

%descremado = (2,8- 2,0 %)x 100/2,8

1.11 MATERIA GRASA

La composición cuantitativa de materia grasa se ve afectada por factores como la raza, alimentación, clima y sanidad. Existe mayor proporción de tenor graso en raza **como ANGLO-NUBIAN** respecto a las europeas.-

Esta constituida por sustancias grasas propiamente dichas: colesterol, triglicérido (98-99%),mono y diglicéridos, lecitinas, vitaminas A y D.

Los ácidos grasos de los triglicérido de la leche son:

40% totalmente saturados (palmitico, estearico)

30% monoinsaturado (oleico)

4-5% poliinsaturados (linoléico y linol.

Es prácticamente rica en tres ácidos graso: **cáprico, caprílico y caproico,** que representa en la leche de cabra el 17% del total de ácidos grasos, contra un 5% que los mismos representan en la leche de vaca. Esta particularidad es la que le confiere a los quesos el gusto caprino tan característico.

El tamaño de los glóbulos grasos en la leche de cabra es mas pequeño y oscila entre 2- 4 micras . El tamaño de los glóbulos grasos presenta un interés nutricional evidente, puesto que una estructura globular de diámetro inferior a 5 micras disminuye el tiempo de residencia en el estomago y el transito intestinal.

Este es un argumento a favor de esta leche en los países que la consumen, donde muchos médicos la recomiendan a niños y ancianos.

Los glóbulos grasos experimentan modificaciones durante, el ordeño, el almacenamiento de la leche en el tambo y las manipulaciones durante el transporte hasta la industria.

El ascenso de los glóbulos grasos en la cabra está dificultada por su tamaño y por la mayor viscosidad de la fase acuosa, además no aglutinan , es decir no forma grumos después de enfriada la leche. Es porque aparentemente en la leche de cabra falta la aglutinina que existe en la leche de vaca.-

E l colesterol analizado varía en un rango de 17 a 39 mg/100ml, mientras que la leche de vaca normalmente contiene de 7 a 10 mg./100ml.

1.12 Hidratos de carbono

La leche de vaca presenta un mayor porcentaje de lactosa. Su valor varía en función del estado de lactación de 4,4 a 4,7 %. Sin embargo es el componente que permanece más estable durante la lactancia.

En cantidades vestigiales posee otros como glucosa, (0,1%).

La lactosa es un disacárido reductor, formado por galactosa y glucosa se origina en las glándulas mamarias.

Otorga a la leche su sabor ligeramente dulce. Su proporción cuantitativa es bastante constante. Favorece la presencia de bacterias formadoras de ácido láctico, fenómeno que es aprovechado para la obtención subproductos (yogur, queso, kefir).

1.13 PROTEINAS

Las proteínas lácteas se encuentran distribuidas en micelas de unos 100milimicrones de diámetro, formando un sistema coloidal altamente estable, sensible sólo a las disminuciones de pH.

Existen distintos tipos de proteínas lácticas que se clasifican como **caseína** (insoluble a pH 4,5), proteínas del suero (permanece en solución a pH 4,6) y proteínas de la membrana del glóbulo graso.

Constituyen la principal variable en quesería, debido a que las variaciones en las tasas proteicas explican el 75% de las variaciones en el rendimiento quesero.-

Se subdividen en :

Proteínas coagulables: representan un 70% de las proteínas totales

Proteínas no coagulables: representan el 30% de las totales son en gran parte eliminadas en el suero.

CASEINA:

La caseína representa la fracción mayoritaria de las proteínas su importancia es relevante en el comportamiento químico y tecnológico .

Un factor analítico de referencia, particularmente representativo del valor como materia prima de la **industria quesera** la **relación entre el contenido de caseínas y el de proteínas totales, el cual es sensiblemente constante**, para leche de cabra es 75,6%, mientras que para leche de vaca es 77.8%

Se observan diferencias muy netas en la distribución de las fracciones caseínicas de la leche de las dos especies. Una diferencia muy marcada es la escasa presencia de caseína alfa S1 de la leche de cabra respecto a la de vaca. Además la leche de cabra contiene más caseína en forma soluble que la leche de vaca; una gran parte de esta caseína esta constituida por la caseína beta.

Son un grupo de proteínas que contienen fosfato, que son especificas de la leche, precipitan a pH 4,6. Contiene C,H,O,N,S,Y P.

Al pH de la leche(6,7) la caseina esta como **caseínato de calcio y magnesio,** en menor proporción de sodio y potasio. Contienen también fosfato de calcio amorfo y citrato en pequeñas cantidades. Al conjunto se lo denomina complejo cálcico- fosfato tricálcico y tal complejidad del sistema determina que las caseínas no pierdan su estado coloidal aún a temperaturas de más de 100°C.

Las caseínas tienen su punto isoélectrico en pH 4,6. Si se acidifica, agregar NaCl O $MgSO_4$ a saturación, las caseínas precipitan formando un coágulo, redisolver en medio alcalino.

Se ha descripto cuatro tipos de cadenas polipeptídicas llamadas:caseína alfa, beta, kappa .

La propiedad común a todas ellas es su escasa solubilidad a pH 4,6 y se diferencian una de otras en contenido de ácido fosfórico que esterifican sus aminoácidos.

❖ **CASEINA ALFA:**

Es una mezcla de proteínas con propiedades funcionales diferentes: las alfa **s** (**s_1 y s_2**) son coaguladas por los iones calcio y la alfa **k** no es sensible, al calcio y estabiliza la micela de caseína.

Se observan diferencias muy netas en la distribución de la fracciones caseínicas de la leche de las dos especies. Una diferencia muy marcada es la escasa presencia de caseína **alfa s_1** de la leche de cabra respecto a la de vaca.

❖ **CASEINA BETA:** Posee un punto isoeléctrico a pH 4,5. Su molécula puede considerarse semejante a un detergente aniónico, con una cabeza cargada negativamente y una cola esencialmente hidrofóbica, sin carga.

Además la leche de cabra contiene más caseína en forma soluble que la de vaca, una gran parte está constituida por la **caseína beta**.-

❖ **CASEINA GAMMA:** Punto isoelectrico en pH (5,8-6). Son productosde la ruptura de la caseina beta por acción de la plasmina

.

❖ **CASEINA KAPPA:** Tal cual como se la extrae de la leche, está formada por una mezcla de polímeros. Aparentemente desempeña un importante papel

consistente en impedir la agregación y precipitación de las partículas coloidales (coagulación).

En las micelas, el núcleo estructural está formado por caseinatos alfa s y beta de calcio protegido por una envoltura de caseínas kappa.

1.14 ENZIMAS

Se han detectado hasta 50 enzimas de todo tipo excepto ligasas. Algunas forman parte de los leucocitos (catalasas) y otras (plasmina) provienen de la sangre. Sin embargo, la mayoría son componentes o productos de las células mamarias que llegan a la leche en el proceso de secreción.

La concentración enzimática de la leche varía de un animal otro. Puede mencionarse entre las enzimas lácticas:

- **OXIDASA**

a)**xantinoxidasa:** Asociada principalmente a la membrana del glóbulo graso. Su sustrato es la xantina y varios aldehidos.

Reduce al nitrato a nitrito (que es un potente inhibidor de algunas bacterias).

b)**Sulfhidriloxidasa:** Se encuentra como un conglomerado de subunidades de alto peso molecular. Cataliza la oxidaciones de tioles a disulfuro, utilizando O_2 molecular que se reduce a H_2O_2..

c)**Catalasa:** Cataliza la descomposición de H_2O_2 a H_2O y O_2. . Abunda en hígado, eritrocitos y riñones, por lo que su actividad es mayor en leche mastíticas y un calostro que en la leche normal. Aumenta al proliferar las bacterias ,se acumulan en la capa de crema.

d)**Lactoperoxidasa:** Cataliza la oxidación por H_2O_2 de aminas aromáticas, fenoles, ácidos aromáticos, tirosina, triptofano, ascorbato, I^- ,NO_3^- , Y SCN^-. Al actuar sobre el tiocianato, origina un compuesto oxidado que inhibe ciertas bacterias. La actividad de la enzima aumenta con la lactación

e)**Superoxidodismutasa:** Cataliza la dismutación del ión superóxido de H_2O_2 y O_2 . Resiste temperaturas de 36°C. Constituye un importante antioxidante de los componentes lácteos.

LIPASA

La lipoproteín lipasa esta implicada en los problemas de lipolisis espontánea e inducida.

Es muy termolábil, se inactiva en la leche después de algunos segundos de calentamiento a 72 °C o de algunos minutos a 60°C.-

En la leche de cabra se encuentra localizada en la fase grasa (45%) contrariamente a lo que sucede en la leche de vaca, en la que se encuentra del 5 al 30%, mientras que está unida a la micela de caseína en poca cantidad, 8%

frente al 77% en la leche de vaca.

La cantidad de lipasa está muy relacionada con una lipolisis espontánea, debido a las particularidades del sistema lipolítico.

TRANSFERASAS-

lactosasintetasa: Es un componente que transfiere grupos galactosilo en ausencia de alfa-lactalbúmina.

HIDROLASAS -

a)lipoproteinlipasa: Libera ácidos grasos de las lipoproteínas y quilomicrones de la sangre para que estos sean absorbidos por las células secretorias de las glándulas mamarias. En mayor proporción está unida a las micelas de caseína.

1.14 FOSFATASA

b)fosfatasa alcalina: Se han encontrado isoenzimas principales de distinta ubicación: **alfa- fosfatasa (en el plasma de la leche) y beta- fosfatasa (en la membrana del glóbulo graso).** Su actividad se manifiesta a pH próximo a 9.

En la leche de cabra el contenido de fosfatasa alcalina es tres veces inferior al de la vaca, cualquiera sea la estación del año.

Esta enzima, esta adsorbida en la superficie de la membrana de los globulos grasos o asociados a las lipoproteinas. Su concentración en la leche de cabra varía de 11 a 13mg/l.

Esta enzima se destruye a 70°C en treinta segundos y su actividad se reduce al 75% a 60°C durante tres minutos.

En leche de cabra el contenido de fosfatasa alcalina es tres veces inferior a la de la vaca cualquiera sea la estación del año.

c)**fosfatasa ácida:** pH: óptimo de actividad 4. Se encuentra principalmente en el plasma de la leche . Su concentración es mayor en el calostro y baja en la leche normal.

Tanto la fosfatasa ácida como la alcalina liberan fosfato inorgánico de las caseínas y de los esteres solubles. Al pH de la leche la fosfatasa ácida es la mas activa. La inactivación por el calor difiere mucho en ambas enzimas.

d)**Ribonucleasa:** Actúa sobre los nucleótidos terminados en **citosina o uracilo**.

e)**Lisozima :** Es un poderoso bactericida que ataca las paredes bacterianas.

f)Proteinasa**:** Es igual a la plasmina del plasma sanguíneo. En la leche fresca se encuentra como una protoenzima inactiva. Con el tiempo es activada las proteínas lácteas más sensibles son las beta y alfa caseínas.

Sobrevive a la pasteurización . A veces incluso su actividad por tratamiento a 72°C.

Es responsable del sabor amargo, cambios de viscosidad y aspecto de productos lácteos .

1.15 PROTEINAS DEL LACTOSUERO

Esta formadas por un grupo variado:

- **alfa-lactoalbúmina**
- **beta- lactoglobulina**
- **albumina del suero sanguineo**
- **imnunoglobulinas**
- **peptidos de bajo peso molecular**

Representan el 20,4% del nitrogeno total, proporción proxima al leche de vaca, aunque la distribución entre las diferentes fracciones es distinta; en la leche de cabra existen concentraciones cuatro veces menores de lactoalbúmina y tres veces menores de albúmina sérica, por el contrario existe más lactoglobulinas.

1. 16 MINERALES.

Pocos alimentos son tan ricos de sustancias minerales como la leche. Comprenden sales solubles e insolubles.

El ácido cítrico es componente presente en un 0,2- 0,4% bajo la forma de **sales** solubles. Su concentración varía con el tipo de alimentación del animal .

En general, el tenor de sustancias minerales de la leche va modificándose desde el alumbramiento hasta los valores normales después de las 72 horas.

Representan una pequeña fracción de la leche de cabra desde 0,5 a 0,8 g/100ml

La leche de cabra es rica en calcio, magnesio y fósforo que la leche de vaca.

Algunos de estos elementos tiene importancia en el aspecto tecnológico, como por ejemplo el calcio que interviene como fosfato de calcio en los fenómenos de coagulación, equilibrios la estabilidad de la leche frente al calor.

Conclusión:

En vista del hecho que la leche de cabra es principalmente usada en la industria quesera, las diferencias en cuanto su composición y características han sido reportadas con respecto a la leche de vaca, a fin de establecer correlaciones con los aspectos tecnológicos

CAPITULO 2: FACTORES CAUSANTES DE VARIACION EN LA COMPOSICION QUIMICA.

La leche no tiene una composición rigurosamente constante. Los principales factores de variación pueden ser clasificados en tres grupos:

2.1 LIGADOS AL ANIMAL

- RAZA: variaciones importantes de cantidades producidas y de composición de la leche
- SELECCIÖN GENËTICA
- ESTADO DE LACTANCIA: la riqueza de la leche es inversamente proporcional a la cantidad de leche producida.
- ESTADO SANITARIO DEL ANIMAL: la mayor parte de las enfermedades infecciosas provocan modificaciones en la leche.-

2.2 LIGADOS A LAS CONDICIONES DE CRIA

- ALIMENTACION: Es uno de los factores importantes de la variación en la composición y particularmente en la materia grasa.
- ORDEÑO: Por la tarde la leche es rica en materia grasa con intervalos de 0,5 a 0,8 % y de 0,1 a 0,2 % en proteínas.

2.3 LIGADOS AL MEDIO AMBIENTE

- CLIMA
- ESTACION

CAPITULO 3: PROCEDIMIENTOS EN EL LABORATORIO

♦ 3.1 TOMA DE MUESTRA

El análisis de la leche tiene por objeto determinar su genuinidad y su estado sanitario, dada su importancia como alimento. Antes de seleccionar un método de análisis, es requisito primordial fijar el propósito de la determinación y hacer un muestreo **representativo**.

a) Las muestras pueden estar clasificada como:

- En grandes volúmenes (tanques)
- Envasados en pequeños recipientes (botellas, cajas, etc.)

Las pautas que se deberá tener presente son:

- Para muestrear de un depósito grande , se debe homogeinizar con un buen homogeinizador tomar fluido a distintas alturas, mezclar, agitar suavemente, la cual constituye la muestra final.
- En casos de envases, deberá tomarse una cantidad de elementos tal que haga la raíz cúbica del número total de unidades a analizar, después de diversos cuarteos.

b) Podrán ser tomadas por el técnico responsable del laboratorio o por el personal del tambo lácteo.

c) En todos los casos se debe contar con 250ml de muestra para el análisis físicos- químicos.

d) En el mismo momento de su recepción en el laboratorio se procede a realizar los Ensayos correspondientes.

e) Si no es posible la realización inmediata de las determinaciones, se deberán mantener refrigerada por debajo de los 6° C en la cámara no más de 48 horas, con o sin el agregado de conservadores permitidos, que no alteren la composición de la muestra.

En el laboratorio la preparación y conservación de la muestra y todas las determinaciones físicas y químicas se realizan de acuerdo a los métodos Oficial de AOAC

- **3.2 PREPARACION Y CONSERVACION DE LA MUESTRA**

METODO OFICIAL DE AOAC 925.20- RECOLECCIÓN CONSERVACION DE LA MUESTRA.

La cuantificación de la muestra varía de acuerdo con el análisis requerido.

- Para análisis de rutina recoger aproximadamente 250ml de muestra.
- Si se trata leche embotellada, recoger uno o más recipientes(de acuerdo al tema 3.1 ítems -a) tal como se halla expuesto a la venta.
- Mezclar muy bien trasvasar de un vaso de precipitación a otro y agitar utilizando un homogeneizador.
- Conservar las muestras en un recipiente hermético no absorbente y manténgase frías, a una temperatura por encima del punto de congelación, hasta su examen.

- Llenar completamente los recipientes, para el transporte. Tapar herméticamente y adherir al recipiente una etiqueta que permita identificar la muestra.
- Utilizar conservadores si es necesario tabletas de conservador que Cl_2 Hg, $Cr_2O_7K_2$ u otro conservador no inferior a 2 gr. de producto activo/kg. Ni superior a 4gr/kg de leche.

Pautas

Debemos tener presente para la elección de conservadores:

- El conservador utilizado no debe interferir con la prueba a realizar;
- Con las mismas limitaciones puede añadirse 3 a 4 ml. de una disolución de HCHO al 36% por 100ml de leche.
- Si se pretende someter la muestra a la prueba de la fosfatasa el único puede utilizarse es el Cl_3CH.

METODO OFICIAL DE AOAC-PREPARACION DE LA MUESTRA DE LECHE

- Calentar la muestra a 20° C
- Homogeneizar, trasvasar repetidas veces de un vaso de precipitación a otro perfectamente limpio.

- Pesar o medir rápidamente la muestra a utilizar para efectuar las diferentes determinaciones químicas.

En caso de:

- Si los grumos de nata no se dispersan:
- Calentar en un baño de agua a 38°C, continuar agitando con una varilla de vidrio hasta obtener una muestra homogénea.
- Siempre que la operación no interfiera con la dispersión de la grasa, enfriar la muestra a 20°C antes de transferir la muestra en la que se va efectuar la prueba.

♦ 3.3 ENSAYOS PRELIMINARES

Cada vez que se extrae una alícuota, deberá homogeinizar por agitación en un vaso de precipitación.

CARACTERES ORGANOLEPTICOS

El primer examen que se le realiza a la muestra cuando arriba laboratorio, corresponde a la impresión de los sentidos: Color, sabor y olor.

- **Color**: Blanco amarillento depende del tipo de alimentación y de la raza.
- **Aroma**: Es una sensación compleja en la que se incluye el olor, el sabor y algunos aspectos de la textura.

La leche refrigerada(cruda o pasteurizada) de buena calidad, tiene un suave y característico aroma. Produce en la boca una agradable sensación derivada de su estructura física, el sabor ligeramente salino- dulzaíno.

- **Olor:** En el caso de la leche fresca puede presentar olores extraños que pueden provenir de:
- La alimentación de la vaca,
- Por la composición bacteriana,
- Proceso de elaboración,
- Condiciones de almacenamiento
- Reacciones químicas alternativas.

- **3.4 ENSAYOS FISICOS**

DETERMINACION DEL pH

Aparato

- Peachímetro Orion EA 940

Reactivo

- Soluciones reguladoras buffer a pH = 4,00; pH = 7,00; pH = 10,00
- Utilizar el peachímetro Orion EA 940
- Verificar la calibración diariamente utilizando soluciones de buffers fosfato a pH = 4,00; pH = 7,00;
- Lavar el electrodo, el agitador y la sonda de temperatura con agua bidestilada por lo menos cuatro veces.

- Utilizar para las mediciones de pH un vaso de precipitación de 100ml el cual debe estar enjuagado con la solución muestra utilizando el menor volumen posible.
- Realizar al menos tres lecturas de pH de cada muestras.
- Anotar en el informe correspondiente el valor de pH obtenido del promedio de las determinaciones

PROCEDIMIENTO

- Travasar aproximadamente 70 ml de leche perfectamente homogeneizada en un vaso de precipitación de 100ml.
- Calibrar el Peachímetro automático Orion EA 940 empleando tres soluciones de buffer fosfato a PH= 4,00; 7,00; 10,00.
- Proceder a determinar el pH de cada una de las muestras de la siguiente manera:
- Sumergir el electrodo, el agitador y la sonda de temperatura en la solución muestra .
- Cuidar que quede debidamente sumergido el electrodo. Tener siempre la precaución de enjuagar cuidadosamente el respectivo electrodo con agua destilada después de cada determinación.
- Realizar por lo menos tres lecturas de pH.

METODO OFICIAL AOAC 925.22- GRAVEDAD ESPECIFICA DE LECHE-METODO PICNOMETRICO

PROCEDIMIENTO

Determinar la gravedad especifica a 20°C con un picnometro perfectamente limpio lo primero que se debe llevar a cabo :

- Es que la muestra y dicho instrumento adquieran la misma temperatura teniendo la precaución de condicionar el medio ambiente del laboratorio de trabajo.
- Proceder a pesar el picnometro vacío utilizando una balanza Analitica digital (METTLER AE 240) de buena precisión y sensibilidad,
- Pesar el picnometro lleno con agua destilada determinando así el peso del volumen de H_2O
- Pesar el picnometro con la muestra , previamente el mismo debe estar enjuagado con la solución muestra utilizando el menor volumen posible con la muestra.
- Por cálculos de diferencia de pesada se determina el peso especifico de la leche. (Explicado en el capitulo 1)

METODO OFICIAL DE AOAC -947.05- ACIDEZ TOTAL

METODO VOLUMETRICO

Pautas que se debe tener presente

- Utilizar grandes volúmenes de muestras (20ml con pipetas de doble aforo) y de materiales volumétricos para el titulante (buretas de 25 ml) producen resultados satisfactorios con el mínimo error aceptable.
- Siempre es necesario realizar una titulación preliminar, para determinar el volumen óptimo de muestra y titulante.

- Es importante realizar al menos de dos valoraciones sobre dos porciones idénticas de muestra, promediar los resultados, cuando estos no difieren un volumen mayor de 0,1 ml.
- Enjuagar siempre la bureta con el reactivo titulante.
- Proteger las muestras durante el manipuleo de la exposición al aire y de la agitación innecesaria ,debido a ello a la boca del Erlenmeyer adherir un corte de parafilm.

PROCEDIMIENTO

- Medir con una pipeta de doble aforo 20 ml de muestra trasvasarla a un Erlenmeyer de 250ml de capacidad perfectamente limpio.
- Agregar con una probeta 40 ml de agua exenta de CO_2.
- Adicionar 2ml con una pipeta graduada una disolución de fenoftaleina al 1% en alcohol.
- Titular con solución normalizada de NAOH 0,1N hasta un color rosado persistente. A medida que se descargar ml del reactivo titulante en la muestra agitar el Erlenmyer.
- Expresar la acidez en término de porcentaje de ácido láctico en peso.

CÁLCULOS :

$(V.N)_{NAOH}$ X Miliequivalentes de ácido láctico = g. de ácido láctico

$(V.N)_{NAOH}$X Peso Equivalente de ácido láctico/1000= g. de ácido láctico

METODO OFICIAL DE AOAC 925.23 -EXTRACTO SECO O SOLIDOS TOTALES

METODO I

PROCEDIMIENTO

- Medir 5ml de muestra con una pipeta de doble aforo y
- Trasvasar a una cápsula tarada de porcelana ,preferiblemente de Pt, lo que resulta esencial si sobre la muestra se van a determinar cenizas.
- Calentar sobre una baño de vapor durante 10 -15 minutos, exponiendo al vapor vivo la máxima superficie posible del fondo de la cápsula.
- Llevar a una estufa de aire a 98 - 100°C durante 3 horas.
- Enfriar en un desecador.
- Pesar rápidamente.
- Calcular por diferencia de pesada antes y después de someter la muestra al calor
- Expresar el porcentaje como extracto seco total.

CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES
BIBLIOTECA
Dr. Manuel Belgrano

METODO II

MEDIANTE EL USO DE UN LACTODENSIMETRO

PROCEDIMIENTO

- Determinar el peso especifico de la leche con un lactodensímetro Quévenne (tomar la lectura superior del menisco)

- Medir la temperatura y corregir la lectura del densímetro(L.), consultando la tabla.
- Calcular el extracto seco aplicando la fórmula :

E S % = 0,25L + 1,2 F donde F= porcentaje en grasa de la leche.

L= lectura del densimetro

METODO OFICIAL DE AOAC 945.46 - DETERMINACION DE CENIZAS

PROCEDIMIENTO

- Medir con una pipeta de doble aforo 5 ml de la muestra preparada.
- Trasvasar a una cápsula previamente tarada de porcelana o de Pt adecuada
- Evaporar a sequedad en un baño de vapor o de arena.
- Incinerar en una mufla a no más de 500°C,hasta que la ceniza quede exenta de C.
- Enfriar en un desecador.
- Pesar la cápsula previamente desecada.
- Calcular por diferencia de pesada el porcentaje de cenizas.

2.4 ENSAYOS QUIMICOS DE REFERENCIA

CUANTIFICACIÓN DE MATERIA GRASA

El contenido en materia grasa es un dato fundamental dada su importancia nutritiva de este componente, pero esta sujeto a mayores oscilaciones que los demás por diversos factores.

Por otra parte la valoración en sí presenta dificultades por la naturaleza de la sustancia grasa que está asociada con lecitina y colesterol y ligadas a las proteínas.

"Por tenor en materia grasa se entiende el tenor total en materia grasa y en sustancias lipoides, expresado en porcentaje.

La materia grasa se encuentra en forma de emulsión de glóbulos grasos de 1 a 8 μ de diámetro;

- La leche de cabra tiene un contenido en ácido grasos volátiles prácticamente doble que la leche de vaca (16,6% frente al 8%) . El porcentaje de ácidos grasos saturados varía entre el 65,9 % y el 71,9%.
- La tasa de ácido butírico (TB) varía mucho según las condiciones zootécnicas.

METODO OFICIAL DE AOAC 989.05 - DETERMINACION DE MATERIA GRASA- METODO DE ROESSE GOTLIEB

- Transferir 10 ml de muestra utilizando una pipeta de doble aforo en una ampolla de decantación.
- Adicionar 1,25 ml de NH_4OH y agitar suavemente durante 1 segundo.

- Agregar 10 ml de éter etílico libre de peróxido, tapar muy bien la ampolla y agitar vigorosamente durante un minuto .
- Incorporar 25 ml de éter de petróleo (punto de ebullición inferior a 65°C) Repetir la agitación vigorosa.
- Dejar en reposo durante 30 minutos hasta observar nítidamente las dos capas etérea.
- Transcurrido este tiempo extraer la capa etérea a un vaso de precipitación previamente tarado.
- Posteriormente agregar 10 ml de éter etílico libre de peróxido y agitar vigorosamente durante unos segundos
- Dejar decantar y adicionar 25 ml de éter de petróleo y agitar .
- Dejar reposar durante 20 minutos y realizar otra extracción.
- Repetir esta operación por lo menos tres veces.
- Recoger todas las extracciones en el mismo vaso de precipitación.
- Evaporar por completo los disolventes sobre un baño de arena o un baño vapor.
- Llevar a estufa, secar hasta peso constante a temperatura de ebullición del agua durante 24 horas.
- Enfriar en un desecador
- Pesar el vaso de precipitación en una balanza de buena precisión
- Corregir los resultados de una determinación en blanco efectuada solo con los reactivos.

CALCULOS

Se obtiene por diferencias de pesada

DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas son nutrientes fundamentales en la alimentación humana. Resulta necesario disponer de procedimientos y técnicas adecuadas en cuanto a su aplicabilidad y exactitud.

Las mismas se cuantificaron aplicando el METODO DE KJELDAHL- METODO OFICIAL AOAC-991.20 DETERMINACION DE NITROGENO PROTEICO

En la valoración química de sustancias proteicas los datos son expresados en nitrógeno porcentual N% o sea nitrógeno proteico total.

Este método consiste a grandes rasgo en la digestión con sulfúrico y un catalizador que oxida C a CO_2 y el H_2 a H_2O, pero el N_2 mantiene como NH_4. Después de alcalinizar el producto digerido, el amoniaco se destila sobre un ácido estandarizado y se determina por titulación.

Descripción del Instrumento BUCHI

Consta de una:

B- 435 UNIDAD DE DIGESTION Y LA UNIDAD CONTROL B- 436 DEL BUCHI.

La unidad de digestión consta de dos sistema de portamuestras los cuales están compuestos por seis tubos cada uno de vidrio de alta calidad para soportar altas temperatura. El cual consta de un sistema de cierre hermético. Son colocados

sobre el baño calefactor y conectado a la unidad control B- 436 a partir del cual se selecciona el tiempo y porcentaje de calentamiento al cual es sometido la muestra por un sistema de comandos automatizados.

B- 323 UNIDAD DE DESTILACION

Esta conectada a :

- Un sistema de refrigeración ,
- Tanque que contiene agua destilada,
- Tanque que contiene NaOH al 32%

Los cuales están ubicados en la parte posterior a la unidad de destilación.

En parte Frontal de dicha unidad se encuentra:

- Pantalla y Comandos electrónico que nos permite seleccionar el volumen agua, hidróxido de sodio, tiempo de destilación.
- Erlenmeyer Colector cuya función es recoger los destilados obtenidos a lo largo del proceso.

PROCEDIMIENTO:

Este método consta de las siguientes etapas:

➢ **Etapa 1**

PROCESO DE DIGESTION

- Medir con una pipeta de doble aforo 2ml de muestra
- Trasvasar a los tubos del portamuestra de la unidad de Digestión.
- Realizar un Blanco que trata igual que la muestra.
- Agregar 0,3 g de catalizador

- Verter 10ml de H_2SO_4 concentrado p.a realizar esta operación bajo campana.
- Tapar herméticamente el portamuestra
- Programar la Unidad control con los siguientes parámetros:
    - Seleccionar unidad 1 para 5 muestras 1 blanco.
    - 55 minutos de digestión al 70%; 80% ; 90%
    - 30 minutos de enfriamiento.

En el caso de tener mas de seis muestra por procesar se utiliza las dos unidades del digestor.

- Transcurrido el tiempo de enfriamiento proseguir con la etapa 2

➢ **Etapa2**

PROCESO DE DESTILACION

- Extraer el tubo del portamuestra sosteniéndolo con una pinza.
- Colocarlo en la unidad de destilación B- 323, ubicado en la parte frontal del lado izquierdo.
- Insertar del lado derecho de la misma unidad un Erlenmeyer Colector de 250 ml que contiene 30ml de ácido Bórico al 4%, y dos gotas del indicador Tashiro (pH = 4,65)
- Programar la Unidad de Destilación con los siguiente parámetros:
    - Adicionar 30 ml de agua
    - Adicionar 70ml de hidróxido de sodio al 32%

- Tiempo de espera 4 seg.
- Tiempo de destilación 4 minutos

- Observar el cambio de viraje del indicador a partir de rojo vinoso- amarillo.
- Continuar con la etapa 3

Etapa 3

PROCESO DE TITULACION

- Retirar el Erlenmeyer colector del destilador , titular
- Cargar una bureta de 25ml con una Solución Normalizada 0,1 N de H_2SO_4
- Titular descargando lentamente ml de la solución titulante, agitar vigorosamente el Erlenmeyer, hasta cambio de color del indicador vira al rojo.
- Anotar el volumen gastado, realizar los cálculos expresar en porcentaje de nitrógeno total. Para determinar porcentaje de proteínas se multiplica por el factor = 6,28 correspondiente para leches.

Pautas :

- Siempre es necesario realizar una titulación preliminar, para determinar el volumen óptimo de muestra y titulante.
- Es importante realizar al menos de dos valoraciones sobre dos porciones idénticas de muestra, promediar los resultados, cuando estos no difieren un volumen mayor de 0,1 ml.
- Enjuagar siempre la bureta con el reactivo titulante.

CALCULOS Y EXPRESIONES DE LOS RESULTADOS

NITROGENO% = 1.4007x (Vs – Vb) X N /W

Referencias:

N%=	nitrógeno total de la muestra expresada como %P/P
Vs	= Volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación.
Vb	= Volumen de ácido gastado para el blanco.
N	= Normalidad del ácido normalizado.
W	= Peso de la muestra en gramos

% PROTEINAS = % N x FACTOR

FACTOR = 6,8

. 3.5 CONTROL DEL TRATAMIENTO TERMICO

FOSFATASA ALCALINA

METODO OFICIAL AOAC 979.13 DETERMINACION DE LA FOSFATASA ALCALINA EN LECHE

FUNDAMENTO

El principio de esta reacción se basa es que a pesar de que las fosfatasas están invariablemente presentes en la leche cruda, las mismas son inactivadas por calor a temperaturas aceptadas como satisfactorias para la pasteurización de la leche.

El test involucra la incubación de la muestra con un sustrato en condiciones de pH y temperatura convenientes para la actividad de la enzima.

Si la leche contiene fosfatasa activa, ésta catalizará la liberación de fenol de un sustrato que lo contiene. Por reacción de fenol con un reactivo adecuado, se producirá una coloración que será proporcional a la cantidad de la enzima presente, no destruida durante la pasteurización u otro tratamiento térmico si lo hubo.

REACTIVOS

BUFFER CARBONATO

- Pesar en una balanza analítica 46,89 g Na_2CO_3 y 37,17 g de $NaHCO_3$
- Trasvasar a un vaso de precipitación de 1000ml, agregar agua destilada homogeinizar, agitar, con una varilla de vidrio .
- Verter la solución a un matraz aforado de 1000ml. Enrasar.

SUSTRATO BUFFER

- Pesar en una balanza analítica 0,5 g $PO_4C_6H_5Na$ (fenilfosfato sódico cristalino exento de fenol).
- Trasvasar a un vaso de precipitación agregar agua destilada. Disolver. Agitar con una varilla de vidrio.
- Medir con una pipeta de doble aforo 25 ml del buffer carbonato y verter al vaso de precipitación. Homogeinizar.

- Trasvasar dicho contenido a un matraz aforado de 500ml. Enrasar.

Preparar cantidad suficiente de sustrato para las necesidades inmediatas y almacenar a refrigeración.

REACTIVO CQC

- Pesar en una balanza analítica 40mg de 2,6- dicloroquinona cloroimida, cristalina (especial para la prueba de la fosfatasa)
- Trasvasar a un vaso de precipitación de 50ml
- Agregar 10ml de alcohol etílico al 95% o en 10ml de metanol. Homogeinizar.

Envasar en frasco color topacio de tampón de vidrio.

Recomendaciones:

- Preparar pequeña cantidades;
- Mantener a refrigeración en un frasco de tampón de vidrio.
- Para mayor facilidad transfirir unos mililitros a un frasco de cuentagotas de color topacio calibrado para que vierta unas 50gotas/ml, con tetilla de un material exento de fenol.
- Descartar la solución dentro de una semana o cuando adquiera un color pardo. Esta disolución puede prepararse también disolviendo una tableta INDOX-FHAX en 5ml de metanol.

PROCEDIMIENTO

Tratamiento de la muestra

- Medir con una pipeta graduada de 1ml un volumen de 0,5ml de leche
- Descargar a un tubo de ensayo perfectamente limpio.

- Colocar en un baño de agua termostatizado a 37- 44°C durante 10 minutos.
- Transcurrido este periodo de tiempo agregar 0,5 ml de la solución sustrato buffer, tapar el tubo, mezclar por inversión varias veces, llevar a incubar otros 10 minutos a la misma temperatura.
- Hervir. Enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 10 gotas del reactivo CQC, tapar , agitar , al cabo de 5 –15 minutos se hace la observación del color.
- Paralelamente realizar ensayos de control negativo, positivos y de reactivos.

Control negativo

- Medir con una pipeta graduada de 1ml un volumen de 0,5 ml de leche muestra previamente hervida.
- Proceder ídem al tratamiento de la muestra.

Control Positivo

- Medir con una pipeta graduada 0,1ml de leche cruda .
- Verter a un vaso de precipitación que contiene 100ml de leche muestra hervida. (de no disponer de la misma agregar 1g de fenol al 0,0005%

por ml de leche hervida).

- Conducir el ensayo como el tratamiento de la muestra.

Control de reactivos

- Proceder igual que para el tratamiento de la muestra pero sin agregar leche.

Recomendaciones

- Enjuagar con agua destilada el material de vidrio antes de iniciar el ensayo.

- Usar una pipeta diferente para cada muestra, teniendo la precaución de evitar la introducción de saliva (contiene la enzima).
- No realizar el Test a la exposición directa de la luz solar.
- Evitar en todo momento el contacto con sustancias que puedan tener fenol.
- Al realizar la toma de muestra mezclar previamente, hasta no observar separación de la crema en su superficie.

Resultados

- **Reacción Positiva color azul** indica actividad de la enzima, puede significar:

Leche cruda;

Leche sometida a tiempo y/o temperaturas inferiores a los requeridos para buena pasteurización.

Leche Pasteurizada mezclada con leche cruda.

Reactivación de la enzima

- **Reacción negativa color pardo o gris** carente de fosfatasa activa.

Se puede presentar diferentes resultados

M	C.P	C.N	C.R	Conclusión
-	+	-	-	**Leche bien pasteurizada**
+	+	+	+	**Sustrato descompuesto libera fenol**
+	+	+	-	**Leche contaminada con fenol**
-	-	-	-	**Reactivo de color descompuesto**

Referencia: M= muestra ; C.P = control positivo C.N = control negativo

C.R = control de reactivos.

3.6 CONSERVADORES

METODO OFICIAL AOAC 931.08- DETECCION DE FORMALDEHIDO

Reactivo

Preparación de ácido cromótropico

- Trasvasar a un vaso de precipitación de 100ml que contiene 40ml de agua destilada 42ml de H_2SO_4 (c.) p.a .
- Completar hasta un volumen 100ml. con agua destilada
- Saturar aproximadamente con 500mg de ácido 1-8 dihidroxinaftaleno 3-6 disulfónico .
- Esta solución debe tener un color paja claro

Procedimiento

- Medir con una pipeta de doble aforo 100ml de leche previamente homogeinizada.
- Trasvasar a un Erlenmeyer de 250ml
- Medir en una probeta de 100ml, el mismo volumen de la muestra
- Acidificar agregando un determinado volumen de H_3PO_4 p.a
- Añadir 1ml del reactivo acidificante
- Destilar lentamente a través de un refrigerante provisto de un trap.
- Recoger 50ml de destilado
- Agregar a un tubo de ensayo 1ml de destilado, 5ml de ácido cromotrópico colocarlo en baño María a altas temperaturas durante 15 minutos.

Resultados

• En presencia de ácido fórmico, la disolución adquiere un color púrpura intenso; la intensidad del color varía con la concentración de formaldehído presente.

La prueba de Hehner- Fulton

Reactivo Oxidante:

- Añadir lentamente H_2SO_4 © a un vaso de precipitación que contiene un volumen igual de agua de bromo a saturación.
- Agregar con una propipeta lentamente a 6ml de H_2SO_4 © 5 ml del destilado (enfriando simultáneamente).
- Tomar una alícuota de 5ml de esta mezcla trasvasar a un tubo de ensayo
- Agregar lentamente, enfriando, sin agitar 1 ml de leche exenta de aldehído y añadir un cristal de BrNa .

Resultado

La presencia de formaldehído se traduce en la aparición de un anillo violeta en la interfase.

3.7 HIPOCLORITO CLORAMINAS

METODO OFICIAL AOAC 922.08 - HIPOCLORITOS Y CLOROAMINAS

Es un método poco seguro en presencia de más de 2,5 ppm Cu.

Reactivos

a- solución de yoduro de potasio

- Pesar 7,00 g de IK en un vaso de precipitación.
- Medir en una probeta de 100 ml , un volumen de 100ml de agua destilada y trasvasar. Homogeinizar, agitar con varilla de vidrio la solución.
- Verter dicho contenido a un matraz aforado
- Envasar en un en un frasco color topacio. Rotular
- Utilizar siempre recién preparado

b- Acido clorhídrico diluido

- Medir con una probeta de 250ml, un volumen de 200ml de agua destilada.
- Trasvasar a un vaso de precipitación de 500ml
- Medir con una probeta de 100ml de HCl p.a, verterlo con cuidado al vaso de precipitación. Refrigerar.
- Envasar a un frasco de plástico. rotular . Esta determinación se hace bajo campana siempre

c- Solución de Almidón

- Pesar 1g de almidón soluble, en una balanza analítica, en un vaso de precipitación de 50ml,
- Disolver en 10 ml de agua destilada fría.
- Trasvasar la solución a un vaso de precipitación de 100 ml. y llevar a un volumen de 70ml con agua destilada caliente.
- Someter a calentamiento y mantenerlo a ebullición por tres minutos
- Dejar enfriar a temperatura

- Trasvasar a un matraz aforado de 100ml y completar a volumen con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Medir con una pipeta graduada 5ml de leche, verter a un tubo de ensayo

Agregar 1,5 ml de disolución de IK medido con una pipeta graduada; agitar intensamente y observar el color que adquiere.

Si el color no cambia, proceder de la siguiente manera:

- Medir con una propipeta 4ml de HCl (C.) p.a descargar en el tubo
- Agitar con una varilla de vidrio con el extremo aplanado,observar el color de la cuajada.
- Introducir el tubo a un baño de agua de termostatizado, a una temperatura de 85°C, dejar en reposo durante 10 minutos (durante este intervalo la cuajada asciende a la superficie)
- Enfriar rápidamente introduciéndolo en agua fría.
- Observar el color de la cuajada y del suero.
- Medir con una pipeta graduada 1ml de solución de almidón.
- Adicionar al líquido en el que flota la cuajada y observar el color.

CAPITULO 4. DETERMINACIONES QUIMICAS DE ELEMENTOS MINERALES EN LA LECHE

4.1. MINERALES y SALES

La leche contiene sales tanto disueltas (moléculas e iones) como en estado coloidal. La mayoría de estas sales son de tipo mineral, siendo por ejemplo fosfatos de calcio, aunque también los hay de origen orgánico (que contiene carbono).

La fracción aniónica de estas moléculas suele ser el nitrato, y el catión siempre de origen mineral.

Entre las sales es difícil cuantificar la parte que esta en forma molecular y la que esta ionizada. Por otra parte, no es fácil cuantificar el conjunto de las sales presentes en la leche en estado nativo, ya que los valores dados no pueden ser mas que estimativo. Se puede decir que los valores van de 8 a 10 g/l en la leche de vaca. Son compuestos con características ácidas.

Por el contrario los minerales o las cenizas de la leche pueden cuantificarse, por ejemplo aplicando el método de la AOAC de calcinación a 550 °C. Este método solo permite calcular los minerales, pues las sales de origen orgánico se volatilizan;

Lo mismo ocurre con los cloruros. Las cenizas de la leche tienen carácter básico, pues los minerales presentes son todos óxidos básicos.

Las interacciones entre Ca, Mg, fosfato, citrato y caseínas determinan la composición de la leche y afectan a la estructura de las micelas de caseínas.

Los iones calcio interactúan con algunas caseínas pero también lo hacen con fosfato y citrato, lo que da lugar a la formación de complejos de fosfato cálcico insoluble y citrato cálcico soluble. El equilibrio entre los diversos iones y las propiedades de los complejos son tales que la mayor parte del citrato se encuentra como citrato de calcio y aproximadamente la mitad del fosfato inorgánico se presenta como fosfato cálcico precipitado. Gran parte del magnesio está formando complejos con el citrato reduciéndose la concentración de iones Mg 2+ en solución.

El fosfato clásico coloidal parece un componente esencial de la micela natural. Aunque es posible formar partículas similares a las micelas a partir de caseínas y Ca 2+ solamente, su estabilidad es menor que la de las micelas naturales pero la inclusión del fosfato la incrementa.

La concentración del calcio soluble en la leche está estrechamente correlacionada con la del nitrato soluble y existen pruebas, en el caso de la leche de vaca, que muestran que la secreción del Ca2+ está ligada a la del citrato.

Se han construido modelos basados en los equilibrios establecidos, por separados, durante la ionización del fosfato y el citrato y las interacciones del Ca2+ con los diferentes iones fosfato y citrato.

21% unido a la caseína. Los fosfatos, citratos y sales cálcicas se usan ampliamente como aditivos de la leche durante su procesado.

Los aniones interaccionan con el Ca2+ reduciendo así el disponible para ligarse a la caseína y, por lo tanto, las micelas quedan protegidas frente a la formación de agregados.

Por el contrario, la adición de calcio reduce la estabilidad de la micela y se utiliza para favorecer la formación de cuajada durante la fabricación del queso.

El valor medio de los diferentes minerales de la leche es, en g/l (según WEBBY JHONSON)

AC. CITRICO	K	Ca	Cl	P	Na	S	Mg
1,6	1,41 g/l	1,23 g/l	1,19 g/l	0,95 g/l	0,58 g/l	0,30g/l	0,12g/l

4.2- Distribución de los macroelementos

Ca y P

El calcio y el fósforo son dos elementos fundamentales en la estructura de la micela, condicionan la estabilidad de la fase coloidal, particularmente el Ca, y P son los más importante desde el punto de vista biológico.

CALCIO (Ca)

unido a la micela 2/3

46% en forma esencialmente de (PO4) 2 Ca3

no micelar 1/3

11,5 % en forma de Ca 2+ soluble

21,5% en forma de citrato o de fosfatos moleculares solubles

FOSFORO (P)

- unido a la caseína : 19% orgánico (proteínas fosforiladas) ;30% en forma de (P04)2Ca3 .

- no micelar: 17% orgánico (fosfolípidos) y 34% mineral (fosfatos solubles)

- **Magnesio(Mg)**

Es un elemento muy importante, que interviene, como el calcio, en la estabilidad de la micela. Sin embargo, solo alrededor de 1/3 del magnesio es micelar, el resto se encuentra disuelto.

- **Ácido cítrico**

Es un ácido característico de la leche. Es un ácido tricarboxílico con una función alcohol terciario.

Al formar quelatos con el calcio, permite que la leche tenga mucho calcio disuelto en forma de citrato cálcico. Es sintetizado por la mama a partir de la glucosa o de sus derivados.

- **POTASIO (k) SODIO (Na) CLORUROS (Cl)**

Estos elementos de origen alimentario, junto la lactosa, permiten que exista el equilibrio entre la presión osmótica de la leche la mama y la sanguínea. Sus valores están sometidos a grandes variaciones, por ej. estado sanitario mastitis.

4.3-Distribución de oligoelementos

La cantidad de oligoelementos puede ser variable según los grados de contaminación de la leche después del ordeño, o de la contaminación del animal por factores exteriores (alimentación, medio ambiente, etc.).

Se observa que las caseínas acomplejan un 95% del Mn y del Zn un 50%

un 75% del Fe . Las proteínas solubles no tienen afinidad mas por el Fe, al que fijan en cantidades que van del 18 % al 33%. Los constituyen de los ultrafijados fijan, por el contrario, del 15% al 33% del Cu y del Fe.

4.4- Transferencia de minerales de la ingesta a la leche

- **Macroelementos**

El calcio, el fósforo o el magnesio no dependen de la ingesta, ya que el animal puede recurrir a sus reservas óseas. En caso de carencia, lo que disminuye es el volumen de la leche.

Los elementos potasio, sodio, y Cloro no aumenta en caso de exceso en la alimentación.

- **Oligoelementos**

El hierro y el cobre no aumentan en la leche por un exceso en la alimentación, pero en caso de carencia en la ración la concentración en la leche disminuye.

El cinc, el silicio y el níquel son también independientes de la dieta. Sin embargo, plomo, arsénico, manganeso, cobalto, aluminio, flúor, selenio puede aumentar en la leche en el caso de una fuerte concentración en la alimentación.

El yodo, molibdeno y el bromo son muy sensible a la infesta alimentaria; la cantidad presente en la leche aumenta al aumentar en la alimentación del animal.

4.5-Evolución de los equilibrios salinos en función de los tratamientos tecnológicos

- **Efecto de la temperatura**

La disminución de la temperatura da lugar a la solubilización parcial del calcio micelar; también hace que aumente la solubilidad del PO4HCa, sal más soluble, en frío que en caliente. El aumento de la temperatura trae consigo una disminución de la cantidad del catión calcio (Ca 2+) en forma soluble, que se insolubiliza en la fase micelar en forma de fosfato.

- **Efecto de la adición de sales**

La adición de cloruro sódico favorece la solubilización del calcio micelar. La adición de cloruro cálcico provoca una mayor inestabilidad de las micelas, lo que se utiliza en la industria quesera para facilitar la coagulación de las leches tratadas térmicamente siendo la dosis más usual 0,2g/l.

- **Aplicaciones en la industria quesera**

En la coagulación láctica, la disminución del pH a 4,6 produce la solubilizacion total del fosfato de calcio micelar, por lo que se produce entonces la coagulación por aglomeración de las subunidades micelares.

Conclusión

Los Minerales representan un fracción de la leche de cabra en un rango de 0,5-0,8g/100ml.-

L a leche de cabra es más rica en calcio, potasio, magnesio y fósforo que la leche de vaca.

Algunos de estos elementos tienen importancia a nivel tecnológico, como por ejemplo el calcio, ya que el fosfato de calcio interviene en los fenómenos de

coagulación, en los equilibrios salinos, en la estabilidad de la leche frente al calor etc.

❖ 4.6- DETERMINACIONES QUIMICA DE MINERALES

♦ 4.6 .1- DETERMINACION DE CALCIO

REACTIVOS

A) Disolución patrón de calcio

Solución de calcio: 1mg/ml

- Pesar en una balanza analítica 2,4972 g de C03 Ca, calidad reactivo, previamente desecado a 110°C, en un vaso de precipitación de 100ml.
- Medir y verter con una probeta el volumen necesario de HCl(C.) p.a hasta disolver el reactivo.
- Trasvasar a un matraz aforado de 1000ml. Enrasar con agua destilada.

b) - bis (2-hidroxianil) glioxal al 0,5%

- Pesar en balanza analítica 0,5 g de bis(2-hidroxianil glioxal), usando un vaso de precipitación de 50ml.
- Medir con una probeta 100ml de metanol y trasvasar. Disolver. Agitar con un varilla de vidrio.
- Verter el contenido a un matraz aforado de 100ml. Enrasar

C)- Disolución tampón tris pH 12,7

- Preparar una solución de concentración (p/v)al 10% de K0H.
- Medir con una probeta 100ml de solución de hidróxido de potasio al 10%trasvasar a 1000ml de tris(hidroximetilaminometano) 0,1M .

D) Disolución de oxalato amonico-acido oxálico pH 5

- Pesar en una balanza analítica 27g de oxalato amónico, en un vaso de precipitación.
- Pesar 1,26g de ácido oxálico monohidrato en un vaso de precipitación de 50ml.
- Medir con una probeta de 500ml un volumen de 400ml de agua destilada para cada alícuota. Disolver con varilla de vidrio. Homogeinizar las soluciones.
- Trasvasar a un matraz aforado de 1000ml . Enrasar

E) Indicador rojo Congo

- Pesar en una balanza analítica 0,1g del indicador Rojo Congo hidrosuble.
- Trasvasar a un vaso de precipitación. Agregar 70ml de agua destilada disolver, agitar con una varilla de vidrio.
- Verter el contenido a un matraz aforado de 100ml. Enrasar.

PROCEDIMIENTO

- Medir con una pipeta de doble aforo 20ml de leche, verter a un vaso de precipitación

- Mezclar los 20 ml de leche con un volumen igual de ácido tricloroacético al 20%; dejar en reposo durante 10minutos y filtrar.
- Transferir, con una pipeta de doble aforo, 20ml del filtrado a un tubo de centrífuga de fondo redondo de 50ml de capacidad; ajustar el pH a un valor superior a 5 con la disolución de KOH al 10%, utilizando como indicador una gota de la disolución de rojo Congo.
  - Agregar 10ml de la solución de oxalato amónico -ácido oxálico (d); tapar el tubo y dejar en reposo durante una hora;
  - Centrifugar durante 15minutos a 3.000 r.p.m; Verter cuidadosamente el sobrenadante.
- Disolver el precipitado en 2ml de solución nomalizada de HCl 1N;
- Transferir cuantitativamente la disolución a un matraz aforado, diluir hasta obtener una concentración de calcio que caiga dentro del rango deseado(sí se trata de leche desnatada, transferir la disolución y el precipitado a un matraz de 200ml y enrasar).
  - Preparar una nueva disolución de 1:1;
  - Transferir con una pipeta de doble aforo, una alícuota de 10ml a un erlenmeyer de 125ml de capacidad; añadir 5ml de la disolución Tampón Tris.
  - Preparar un blanco con 10ml de agua y 5ml de tampón.
  - Añadir a la muestra y al blanco 0,5 ml de la disolución de bis(2- hidroxianil) glioxal y 10ml de alcohol, mezclando el contenido de cada tubo antes de proceder con el siguiente.

- Al cabo de 10 minutos , medir las absorbancias de las dos disoluciones a 524nm.
- Calcular la concentración de calcio en la muestra por referencia a una curva patrón preparada por el mismo procedimiento a partir de la disolución patrón de Calcio.

Notas

1- La precipitación con oxalato elimina las interferencias causadas por los fosfatos; el Mg no interfiere, a menos que su concentración exceda 40 µg/ml.

2- La concentración normal de Calcio en la leche oscila alrededor de un 0,126 %.

4.6.2 DETERMINACION DE HIERRO- METODO DE LA BIPIRIDINA-

Reactivos

a- Disolución de 2-2' bipiridina

Pesar 0,2 gramos de 2-2' Bipiridina en una balanza analítica.

Trasvasar a un vaso de precipitación de 100ml que contiene 5ml de ácido acético. Disolver. Agitar con una varilla de vidrio.

Verter en un matraz aforado llevar a volumen con agua destilada

b- Hidróxido amónico aproximadamente de 6N

- Medir con una probeta de 500ml un volumen de 420ml hidróxido de amonio trasvasar aun vaso de precipitación de 1000ml . Agregar 300ml de agua destilada. Homogeinizar bien la solución.
- Trasvasar a un matraz aforado de 1000m. Enrasar con agua destilada

c- Disolución Tampón

- Medir en una probeta 27,2ml de ácido acético trasvasar a un vaso de precipitación que contiene 100ml de agua destilada.
- Pesar en una balanza analítica 33,4 g de acetato sódico. Trasvasar al

vaso de precipitación. Agregar 70ml de agua destilada, disolver, agitar con una varilla de vidrio.

- Verter la solución a un matraz aforado de 250ml. Ajustar volumen con agua destilada.

d- Acido clorhídrico 6N Preparación de esta solución remitirse al capitulo5

Diluir 531 ml de HCl llevando a un volumen de 1000ml, utilizando agua bidestilada.

e- P- Nitrofenol

Disolución al 0,1% en agua destilada utilizando un matraz aforado de 100ml de capacidad.

f- Disolución patrón de hierro

- Pesar en una balanza analitica 0,1 g de alambre de hierro
- Trasvasar a un vaso de precipitación
- Medir con una probeta HCl diluido un volumen determinado.

- Verter en el vaso de precipitación, disolver. Agitar.
- Trasvasar la disolución a un matraz aforado, ajustar el volumen a 1000ml con agua destilada (1ml= 100µg de Fe).
- Tomar 10ml de esta disolución medir con una pipeta de doble aforo
- Transferir dicho volumen a un matraz aforado de 1000m. Enrasar con agua destilada (1ml= 1µg de Fe).

g- Disolución de ácido tricloroacético al 25% en agua bidestilada.

- Medir con una probeta 25ml de ácido tricloroacético verter en un vaso de precipitación de 100ml.
- Agregar 30ml de agua destilada. Transferir a un matraz aforado de 100ml. Enrasar con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

- Agregar a un tubo de centrífuga de 15ml de capacidad que contiene 5ml de leche , 5 gotas de ácido mercaptoacético, 2ml de la disolución tricloroacético y 1ml de HCl .
- Preparar el blanco con los reactivos y 5ml de agua.
- Agitar muy bien. Mantener durante 5 minutos en un baño de agua termostatizado a un rango de temperatura 90- 95°C.
- Enfriar en agua a la temperatura ambiente. Agitar bien para disgregar el precipitado

- Centrifugar durante 15 minutos a 3500 r.p.m. Trasvasar el sobrenadante a un matraz aforado de 25ml.
- Agregar al precipitado que quedo en el tubo de centrífuga, una mezcla de 2ml de agua, 1ml de tricloroacético y 1ml de HCl y repetir el calentamiento, la centrifugación y la decantación. Separar el sobrenadante
- Adicionar al conjunto de sobrenadantes una gota del indicador de p-nitrofenol y lentamente hidróxido de amonio a 6N hasta que la disolución adquiera un color amarillo.
- Acidificar con 1- 2 gotas de HCl 6N (o la cantidad necesaria hasta desaparecer el color amarillo). Añadir 1ml de la disolución tampón; diluir a 25ml y agitar.
- Transferir con una pipeta de doble aforo una alícuota de 5ml a un matraz y llevar a volumen de 10ml con agua destilada. Añadir dos gotas de ácido mercaptoacético para reducir cualquier traza de Fe férrico y 1ml del reactivo 2,2' bipiridina; agitar .
- Leer absorbancia a522 nm en espectrofótometro.

Corregir la lectura restando la absorbancia del blanco y calcular el Fe presente por referencia a la gráfica Patrón. Sí la alícuota tomada es 5ml, este valor equivale al contenido en ppm de Fe en la Leche.

PREPARACION DE LA CURVA PATRON

Tomar 0,1,2,3,4 y 5 ml de la disolución patrón de Fe (f) , llevar a 5ml con agua destilada. Tratar estas muestras como se indica en el procedimiento(excepto en cuanto se puede omitir la centrifugación) utilizando alícuotas de 5ml para la reacción en que se desarrolla el color.

Restar de la lectura obtenida con cada disolución que contenga hierro la de la muestra que carece de este elemento y representar la absorbancias corregidas de las disoluciones en función de los µg de Fe.

NOTAS

Las regulaciones estatales suelen exigir la presencia de 10,63 mg /l, en las leches fortificadas con minerales y vitaminas.

Se encontró en las leches crudas no fortificadas valores dentro del rango 0,0114-0,650 p.p.m de Fe.

4.6.3 METODO OFICIAL DE AOAC- 985.35 DETERMINACION DE MINERALES EN LECHE- POR ABSORCION ATOMICA-

Este método es aplicable a calcio, magnesio, hierro, cobre manganeso, sodio y potasio

Determinación de cobre

Aparatos: espectrofotómetro de absorción atómica

Reactivos

a- disolución de pirrolidin ditiocarbamato amónico al 1%

Disolver 1g de pirrolidin ditiocarbamato amónico, disolver en agua y enrasar en un matraz aforado de 100ml de capacidad.

b- ácido clorhídrico - 2,4N

Tomar cierta cantidad de HCl llevar a 1000ml en un matraz aforado

c- ácido clorhídrico- 6N

Tomar cierta cantidad de ácido clorhídrico llevar con agua destilada a 1000ml en un matraz aforado.

d- ácido clorhídrico 0,1N

Tomar cierta cantidad de ácido clorhídrico llevar con bidestilada a 1000ml en un matraz aforado.

Las soluciones b-;c-; d-; para su preparación remitirse al capitulo 5

PREPARACION DE LA MUESTRA

- Verter 25 ml de leche en una cápsula de platino, agregar 4ml de HCl de 2,4 N y evaporar a sequedad.
- Calentar la muestra deshidratada, lentamente en una mufla a 500°C, mantener durante toda la noche esta temperatura. Se forman así cenizas de color gris.
- Añadir al residuo 2ml de HNO3 y evaporar a sequedad sobre un baño vapor. Flamear la cápsula durante unos minutos e incorporar nuevamente a la mufla, mantener siempre una temperatura de 500°C durante una hora. Así se obtienen cenizas blancas.
- Disolver las cenizas en 5ml de HCl de 6N. Desecar sobre un baño de vapor.
- Disolver nuevamente en 10 ml de HCl de 0,1N. Después calentar a ebullición y transferir a un butirómetro de Babcock para nata, del 50%.

- Agregar finalmente, 10ml de agua destilada a la cápsula de Pt y transferir al butirómetro.
- Añadir al conjunto de disoluciones obtenidas en el butirómetro de Babcock 1ml de disolución al 1% de pirrolidín ditiocarbamato amónico y 5ml de isoamil metil cetona.
- Agitar durante 1minuto y centrifugar durante 10minutos.
- Añadir agua hasta que la fase orgánica entre en el cuello del butirómetro , centrifugar de nuevo durante 10 minutos.

PROCEDIMIENTO

Preparar una serie de patrones que contenga 0,1,2,3,4,5,10,20 y 30 μg de Cu en 5 ml de isoamil metil cetona, tomando alícuotas apropiadas del reactivo (f), añadir a 25ml de HCl 0,1 N en butirómetros de Babcock para nata del 50%, tratar de la siguiente manera:

Someter los extractos orgánicos a análisis de absorción atómica ,

Medir la absorción de la fase orgánica de la muestra y calcular la concentración de Cu de la correspondiente muestra.

notas

1- El agua utilizada debe ser redestilada en vidrio o desionizada.

2- La determinación de cobre resulta de particular importancia en la leche, porque la presencia de concentraciones altas de este elemento causan un aroma anómalo conocido como "a oxidado" o a "cartón".

La leche de vaca normal excepto en las etapas iniciales de lactación contiene 0,02-0,04 ppm de Cu.

4.6.4 Determinación de YODO

REACTIVOS

a- Disolución de Tiosulfato de sodio de aproximadamente 0,1N

Pesar en una balanza analítica 25 g de tiosulfato de sodio pentahidratado disolver con agua destilada someter a ebullición durante 5 minutos, llevar a volumen de 1000ml en un matraz aforado .

Transferir a un frasco previamente ha sido lavado con dicromato de potasio-ácido sulfúrico en caliente y enjuagar con agua hervida.

Conservar en la oscuridad y en la heladera .

b- solución patrón de tiosulfato sódico de 0,005 N

Tomar con una pipeta de doble aforo 50ml de la solución de Tiosulfato de sodio (a), llevar con agua destilada hervida a 1000ml en un matraz aforado. Proceder a la normalización de la solución cumpliendo el siguiente procedimiento:

Transferir con una pipeta de doble aforo 25 ml de una disolución que contenga 0,1308g/l de IK a un erlenmeyer de 500ml de capacidad; agregar 200ml de agua destilada;5ml de una disolución al 20% de sulfato monoácido de sodio (SO3HNa) y 2 g de hidróxido de sodio NaOH. Neutralizar la mezcla con ácido fosfórico PO4H3; agregar un exceso de este reactivo. Utilizar como indicador naranja de metilo.

Añadir un exceso de agua bromada y hervir la solución suavemente hasta decolorarla; continuar la ebullición durante otros 5 minutos.

Agregar unos cristales de ácido salicílico y enfriar la solución a 20°C. Añadir 1ml más de PO4 H3 al 85% y aproximadamente 0, 5 g de IK y titular el Y2 con la disolución de S2O3Na2. Adicionar unas gotas de solución de almidón cuando el color pardo del Y2 liberado haya prácticamente desaparecido.

Si X= mililitros de la solución de tiosulfato gastados en titulación,mg de iodo/ml de la disolución de tiosulfato = 15/X .

PROCEDIMIENTO

- Colocar 3- 4 g de muestra en una cápsula de platino de 200- 300ml de capacidad.
- Adicionar unos 5 g de carbonato de sodio, 5ml de NaOH (1+1) y 10m de alcohol, teniendo la precaución de que se humedezca bien la muestra.
- Desecar a 100°C durante 30 minutos.
- Introducir la cápsula en una mufla a 500°C, mantener a esta temperatura durante a quince minutos. (La incineración de la muestra a 500°C sólo es necesaria para carbonizar la materia orgánica soluble que puede oxidarse con el agua bromada). Si es necesario, utilizar temperaturas superiores a 500°C. Enfriar
- Adicionar 25ml de agua destilada; cubrir la cápsula con un vidrio reloj y hervir durante 15 minutos.

- Filtrar a través de un papel de filtro, lavar con agua caliente.
- recoger el filtrado y los lavados en un vaso de precipitación de 600ml de capacidad.
- Agregar un exceso de agua bromada y someter a ebullición hasta lograr la decoloración; después prolongar la ebullición durante 5minutos. Adicionar unos cristales de ácido salicílico y enfriar la disolución a 20 °C.
- Agregar 1ml de ácido fosfórico al 85% y aproximadamente 0,5 g de IK . Proceder a titular con la solución de tiosulfato de sodio de 0,0005N.

CAPITULO 5: OPERACIONES TRADICIONALES EN EL LABORATORIO DE LACTOLOGIA

En esta sección se tratara de discutir cuales son los requerimientos mínimos para que un laboratorio realice ensayos físico- químicos de leche.

Todo trabajo de análisis requiere y exige del especialista químico una atención permanente de los detalles.

El Análisis de leche tiene por objetivo

- Comprobar si sus valores corresponden a las características de composición genuina.
- Evidenciar adulteraciones o fraude.
- Controlar el tratamiento térmico al que fue sometida.

Tener presente que antes de seleccionar un método de análisis, es requisito primordial fijar el propósito de la determinación y hacer un muestreo representativo.

Cualquiera sea el método determinativo incluye varias etapas que son comunes en todo tipo de análisis:

- Toma de muestra
- Preparación y conservación de la misma
- Tratamiento
-Procesamiento de la muestra

Sobre estos temas remitirse al capitulo2

Materiales de laboratorio, reactivos, Instrumentación

Material de vidrio

Por lo general se utilizar materiales de vidrio al borosilicato y de polietileno, teflon, etc.

Cualquier vidrio que sea resistente a:

- Temperaturas y al lavado con diferentes soluciones.
- Ataque de ácidos, bases, oxidantes y reductores.

Se debe prestar especial cuidado con los materiales metálicos, ya que es posible su corrosión en los ambientes de trabajo.

- Los contenedores de vidrio son inadecuados para guardar soluciones sobre todo si son alcalinas, en estos casos son preferibles botes plásticos, debidamente rotulados.
- El rotulo de cualquier solución sea patrón primario o no, se deberá especificar:

Nombre completo de la droga

Fecha de preparación

Titulo de la solución y si esta sujeta a valoración diaria

Si es patrón primario, secundario.

- **Material volumétrico**

El material volumétrico se clasifica en:

- Para contener

Puede ser exacto y aproximado

- Para verter

Exacto y aproximado

Los materiales para contener en forma exacta son los matraces aforados y los aproximados son los vasos de precipitación, balones, erlenmeyers.

Los materiales para verter en forma exacta son pipetas de doble aforo y las buretas, para verter volúmenes aproximados son pipetas graduadas y las probetas.

Los materiales para verter en forma exacta se debe utilizar para medir las muestras, las soluciones patrones .

Recordar que cada vez que una técnica especifique un volumen con dos decimales (10,00ml por ejemplo)

Reactivos

Agua es el reactivo universal, todas las soluciones se preparan con este elemento.

El agua a utilizar para todas las determinaciones de laboratorio deberá ser bidestilada, su pH será mayor 6,0 y la conductividad menor 2μmhos/cm, en general el agua no debe contener el o los elementos que se quieren determinar.

Los reactivos para preparar soluciones deberá ser siempre grado p.a o bien grado ACS (America Chemical Society), cuando sean necesario patrones primarios deberán tener un grado de pureza del 99,99% o similar, en los casos especificados como por ejemplo para la preparación de patrones de absorciometría debe usarse grado " absorciométrico", para cromatografía grado "cromatografico".

Cuando el grado no esta certificado, o cuando la droga no haya sido conservada adecuadamente, usar procedimiento de purificación , como la disolución recristalización, especialmente para los colorantes, la filtración, la sublimación etc.

Las drogas patrón primario, tren todas las especificaciones técnicas y una certificación NIST(National Institute of Standard and Tecnology)

Droga patrón primario

Es aquella que por simple pesada y posterior dilución a un volumen definido se obtiene una solución de titulo exactamente conocido. Esta solución es una solución patrón primaria.

Listado de algunos patrones primarios

Para acidimetría

Biftalato de potasio, Acido Benzoico, Carbonato de Sodio anhidro

Para redox

Oxalato de sodio

Trióxido de arsénico

Dicromato de potasio.

Una solución preparada a expensas de una droga grado p.a que para ser utilizada es necesario primero la determinación de su titulo exacto se denomina "Patrón secundario", son de este tipo las soluciones de ácidos clorhídrico, sulfúrico, bases como hidróxido de sodio o de potasio, etc. Todas estas soluciones deben ser valoradas diariamente, antes de su utilización.

Las soluciones de indicadores se preparar a partir de la sal sódica por dilución en agua, aunque hay casos en que la disolución debe ser realizada en alcohol, cuando este sea el caso utilizar alcohol de 95° o superior.

Las drogas sólidas especialmente los patrones primarios deben ser secados a 105 – 110 °C durante al menos 2 horas y enfriados en desecador para eliminar el agua que pudiera humedecerlos.

La concentración de cualquier solución debe ser expresada en molaridad la Normalidad esta restringidas solo para los casos de volumetrías.

Las expresiones ppm, ppb, deben expresarse como mg/l , µg/l y en todos los casos especificar el medio en que se realizó la disolución.

Preparaciones de soluciones

PREPARACION DE HIDROXIDO DE SODIO (NaOH) 0,1 N

Las etapas a seguir son las siguiente:

1era etapa: Realizar los cálculos necesarios

2do etapa: Preparación de la solución

3er etapa: Valorar la solución con un patrón primario

1era ETAPA

cálculos:

1N -------1000ml--------40g. de NaOH

0,1N------1000ml-------x= 4g de NaOH

2da ETAPA

Pesar en un vaso de precipitación de 250ml de capacidad, perfectamente limpio 4 gramos de OHNa de alta pureza en una balanza analítica. Disolver en agua bidestilada, refrigerando convenientemente la solución, ya que es muy exotérmica.

Una vez fría la solución de trasvasar a un matraz aforado de 1000ml, se lleva con agua bidestilada hasta completar volumen, y homogeneizar convenientemente. Trasvasar a un envase de plástico. Rotular convenientemente de acuerdo a lo especificado en el tema de rotulación.

3era. ETAPA

Se procede a valorar la solución de NaOH con solución de biftalato de potasio a 0,1 N (droga patrón primario). Utilizando como indicador la fenoftaleína.

PREPARACION DE BIFTALATO DE POTASIO A 0,1N

Tamizar 15 a 25g de biftalato a través de un tamiz de 100 mesh, secar a 120°C durante 2 horas. Enfriar en un desecador.

cálculos

1N----------1000ml----------204,19 g de biftalato

0,1N----------1000ml----------x=20,419 g de biftalato

1N----------1000ml----------204,19 g de biftalato

0,05N---------1000ml ----------x= 10,2095g de biftalato

Pesar 20,419g de biftalato de potasio en un vaso de precipitación de 250ml, disolver en agua destilada libre dióxido de carbono (previamente hervir y enfriar), llevar a volumen en un matraz aforado de 1000ml de capacidad.

Guardar la solución en botella de plástico, al abrigo del aire.

Recordar

Preparar las soluciones patrones y de Stock con agua previamente hervida y enfriada.

SOLUCION DE NaOH (1+1) al 50%

Pesar 50g de HONa en balanza granataria sobre vidrio reloj o mejor aún en vaso de teflón o de Plástico. Adicionar 50ml de agua destilada libre de CO_2; disolver con una varilla de vidrio y envasar a 100ml en matraz aforado.

Guardar la solución en frasco de polietileno.

CARBONATO DE SODIO 0,05 N- PATRON PRIMARIO-

Secar a 250°C durante 4horas, 5 g de Na_2CO_3 patrón primario, enfriar en desecador.

Pesar la cantidad necesaria para preparar 1000.00 ml de solución 0,050N, usando parar la disolución agua bidestilada previamente hervida y enfriada.

Está solución no se puede utilizar por más de una semana.

SOLUCION DE HCl O H_2SO_4 0,1N

Preparar 1000ml de cada una de titulo aproximado, partiendo de ácido de buena calidad concentrado.

NORMALIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS

- Colocar en un vaso de precipitación o en un Erlenmeyer, 40ml de Na_2CO_3 0,05N y alrededor de 60 ml de agua bidestilada.

- Utilizando el método potenciométrico, titular con los ácidos hasta pH 5 ; calentar a ebullición durante 3-5 minutos. Cubrir con vidrio de reloj y enfriar a temperatura ambiente . continuar titulando hasta pH 4,3. Calcular la N del ácidos.
- Para titulación por método visual, utilizar el método de Koltoff y Sandell, con dos indicadores.
- Usando la normalidad calculada ajustar el título a 0,1000N, tal que 1mml de solución valore 5mg de $CaCO_3$.
- Solución estándar de ácido Clorhídrico 0,02N : Diluir 200,00ml de solución 0,1000N a 100,00 ml, valorar potenciometricamente usando 15,000ml de Na_2CO_3 0,050N. 1mml de esta solución valora 1mg de $CaCO_3$.
- Solucion mezcla de indicadores pH 4,5 verde de bromocresol –rojo de metilo pH 4,5.-
- Solución de indicador de pH 8,3 Púrpura de metacresol y solución de fenoftaleína.

Procedimiento

Indicación visual

Tomar 20ml de muestra , realizar una titulación preliminar utilizando como indicador la mezcla de verde de bromo cresol- rojo de metilo y solución normalizada de ácido 0,100N. De acuerdo al volumen de muestra tomado y al volumen titulante al gastado en la valoración decidir sobre la cantidad de muestra que utilizará en las valoraciones posteriores y el título del valorante.

Sobre una alícuota de muestra agregar 5 gotas de indicador púrpura de metacresol o bien fenolftaleína , si el color de la solución en esta instancia es púrpura, proceder a titular con solución normalizada de ácido clorhídrico hasta virajes persistente del indicador. Consignar el volumen como VF.

Sobre otra alícuota de muestra agregar 5 gotas de indicador mezcla y valorar con ácido normalizado hasta viraje del indicador. Consignar el volumen VH.

Recordar tomar las mismas precauciones que para la determinación del título de las soluciones.

Solución tampón o buffer de pH 10

Disolver 16,9 g de cloruro de amonio en 143 ml de hidróxido de amonio y diluir a 250 ml con agua destilada. Esta solución debe conservarse en botellas de plástico o de vidrio al borosilicato. Tapados correctamente y al abrigo de CO2 del aire. Esta solución es estable durante un tiempo no mayor de 30 días.

Indicadores alternativos método KJELDAHL

Indicador Scher o pHmetro pH = 4,65

Disolver 0,01 g de rojo de metilo; 0,02g de azul de bromo timol y 0,06g de verde de bromocresol en 100ml de etanol al 70% v/v

Conservar esta solución en lugar oscuro y frío (pH= 4,6 ± 0,1).

Indicador utilizado para el equipo BUCHI

B) Mezclar 250 mg de azul de metileno y 450mg de rojo de metileno. Disolver en alcohol etílico , trasvasar a un matraz aforado de 250ml. Enrasar con alcohol etílico de 95% . Usar 0,1 ml por muestra.

- **Catalizador**
- Pesar en un vaso de precipitación 0,3g de SO_4Cu utilizando una balanza analítica.
- Pesar en un vaso de precipitación 99,7 g deK2 SO4 en una balanza granataria.
- Trasvasar el contenido de la alicuota 1 y 2 a un mortero de ágata , mezclar muy bien . Envasar en un frasco color topacio.

ALCOHOL n- BUTILICO neutralizado

Añadir a alcohol n -butilico de punto de ebullicion 116-118°C NaOH 0,1 N, hasta que una pequeña alícuota utilizada para control dé un color verde o azul claro con indicador de azul de bromotimol.

CATALIZADOR

- Pesar en un vaso de precipitación 200mg de **$SO_4Cu.\ 5H_20$ utilizando** una balanza analítica.
- Agregar 100ml de agua destilada. Disolver. Agitar con una varilla de vidrio.
- Envasar en frasco color topacio.

Mantenimiento y Calibración de Equipos

De acuerdo al método de análisis seleccionado cualquiera de ellos necesitará utilizar balanza analitica para deteminar masas

- Todas las balanzas se revisan, limpian y calibran cada seis meses aproximadamente.
- Debe existir un cuaderno o planilla en la queda asentados estos procedimientos.

- Las balanzas se calibran cada mañana con pesas. Las pesas a utilizar dependen del modelo de balanza. Habiendo pesas patrones de 10g. ,50g. , 100g., 500g., y 1000g.
- En el laboratorio de lactología hay dos balanza :

Balanza Analítica METTLER – MAX: 160g ; D 0,01m

Balanza Analítica digital METTLER AE240 de muy alta precisión y sensibilidad.

Peachimetro

El medidor de pH básico deberá tener una capacidad para medir pH comprendidos entre 2- 14. El mismo debe ser estandarizados antes de su uso cada día y asentar los datos en la planilla de registro asignado a tal fin.

Los amortiguadores de pH 4, ph7 y pH deben utilizarse para calibrar el peachimetro y debe hacerse cualquier ajuste de compensación de temperatura.

Descripción de Instrumento titulador automático y peachimetro Orion EA 940

El sistema de Auto químico Orion 960 ofrece una variada gama de técnicas analiticas, de técnicas sofisticadas de incrementos de volumen para la simple detección del punto final de titulaciones.

El sistema es fácil de entender, con un display de 40 caracteres alfanúmericos que posee el ORION EA 940 pH/ISEMetro

El ORION 960 consiste del módulo 960 ORION y un EA 940 pH/ISE- Metro, que se sitúa por encima de la base del módulo 960.El módulo consiste de un microprocesador, que controla el sistema, un Autodispenser, una torre de electrodo. El EA 940 provee el displayy el teclado de la información.

Los paneles de frente

El EA 940 Metro pH/ISE Metro es el corazón del sistema Auto químico del Orion 960

El display o visor muestra todos los mensajes

Teclado :

Teclas	funciones
Yes	Presionar para responder afirmativamente.
No	Presionar no para responder negativamente
?	Presionar y mantener sostenida para obtener información adicional
2nd funtion	Presionando da entrada a la segunda función de las teclas
números	Introducen los valores numéricos.

Calibración con amortiguadores de pH

Se debe contar con los buffer perfectamente identificados con fecha de preparación y vencimiento.

Para una operación rápida , es posible estandarizar el electrodo a pH solamente (un punto de calibración), pero es mejor calibrar en dos puntos.

Procedimiento

1. Enjuagar el electrodo con agua destilada, sumergir el extremo del electrodo 2,5 cm en un vaso de precipitación conteniendo la solución buffer de pH 4,00, pulsar el comando del agitador y dejar que se estabilice el electrodo
2. Secuencia que debe seguir es la siguiente

Display pulsar

Operador menú yes

Calibrate 1pH 2nd funcion, Then 2

Presionar el botón de acuerdo a lo expuesto en el punto 2 , está equipado con un indicador de lectura estable. En la pantalla parpadeará 4,00 hasta la estabilización del electrodo.

Cuando el 4 dejó de parpadear la calibración puede ser confirmada. Aguardar unos segundos.

Aplicar la misma secuencia para el buffer de pH 7,00 y 10,00.

Tener la precaución después de cada medición enjuagar el electrodo con agua destilada.

La medida de pH de cualquier muestra es directamente afectada por la temperatura. Por lo que debe conocerse la temperatura a la cual se está midiendo el pH. Para usar el medidor automático de temperatura sumergirlo en la muestra. En el display se visualiza la lectura de la temperatura.

Baño María

Todos los baños María debe llenarse con agua destilada o desionizada. Se debe colocar un termómetro en el baño y registrarse (cuando se utilice) en una planilla de registro de monitoreo del instrumento. El baño María del laboratorio deberá tener un botón de control de temperatura y una luz indicadora.

- Los rangos de temperatura adecuados se listan en al planilla de registro y el baño debe ajustarse de acuerdo a los limites establecidos.
- El registro de la temperatura de los baños será realizada una vez al día por el primer turno que los ponga en funcionamiento.

- En caso de variar la temperatura ajustar con la perilla de control de temperatura chequeando con el termómetro hasta mantenerla constante. En caso de continuar la variación llevar al servíce.
- Se deberá tener cuidado para evitar que el baño se seque cuando esté en uso.
- Los baños María deberán limpiarse y rellenarse con agua limpia cada mes o cuando sea necesario. El mantenimiento sanitario general alargará el período de vida del baño María.