

**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
573-79**

**LECHE Y SUS DERIVADOS.  
DETERMINACION DE ACTIVIDAD  
FOSFATASICA.  
METODO DE REFERENCIA**



TRAMITE

COMITE: CT10 ALIMENTOS  
PRESIDENTE: Dr. Alvaro Llopis  
SECRETARIO (ENCARGADO): Lic. Arantza Bilbao

SUBCOMITE: CT10/SC4 LECHE Y SUS DERIVADOS  
COORDINADOR: Farm. Azucena Mendoza Echeto

PARTICIPANTES

ENTIDAD

REPRESENTANTES

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRIA ESPECIALIDADES ALIMENTICIAS, S.A. (ESPALSA)	Marisol Castillo María del Carmen Martín Rosmarie de Boer Peter Robl
UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR INDUSTRIAS LACTEAS CARABOBO (INLACA) INDUSTRIAS LACTEAS VENEZOLANA C.A. (INDULAC)	Luis A. Boscan Alicia Hernández Mercedes de Marún
SINDICATO DE LA LECHE S.A. (SILSA)	Silvio Montaña Carmen Hernández
INDUSTRIAS LACTEAS DE PERIJA C.A. (ILAPECA)	Edgardo Oyarce
MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL U.C.V. FACULTAD DE FARMACIA	Alvaro Llopis Fanny Padilla
CONCEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNOLOGICAS (CONICIT)	Trina Michelangeli
INSTITUTO DE COMERCIO EXTERIOR C.A. VENEZOLANA DE ALIMENTOS	Gladys Robles José Félix Chávez
ROYAL PRODUCTOS ALIMENTICIOS C.A.	Ingrid Esaa

TECNIALIM C.A.

Orlando Guédez

ASOCIACIÓN DE INDUSTRIALES DE ACEITE Y GRASAS

VEGETALES COMESTIBLES (ASOGRASAS).

Jorge Imbs

DISCUSION PUBLICA:

Fecha de Envío: 12-7-78

Duración: 2 meses

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 17-1-79

FECHA DE APROBACION POR COVENIN: 12-06-79

NORMA VENEZOLANA	COVENIN
LECHE Y SUS DERIVADOS	573 -79
DETERMINACION DE LA AC- TIVIDAD FOSFATASICA.	
METODO DE REFERENCIA	

### 1 ALCANCE

Esta norma contempla el método de referencia para la determinación de la actividad fosfatásica de la leche y sus derivados. El método se utiliza para controlar si el proceso de pasteurización ha sido efectivo.

### 2 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

COVENIN 938-76 Leche y sus derivados. Métodos para la toma de muestra de leche y productos lácteos.

### 3 DEFINICIONES Y TERMINOLOGIA

3.1 FOSFATASA ALCALINA. Es una enzima que se encuentra en la leche cruda asociada a los microsomas presentes en los glóbulos grasos, tiene un pH óptimo de actividad de 9,75 y se destruye progresivamente con el calor, razón por la cual su determinación sirve para controlar la eficiencia de la pasteurización.

3.2 ACTIVIDAD FOSFATASICA. Es la cantidad de fosfatasa alcalina activa presente en la leche y sus derivados, expresada por el número de microgramos de fenol liberado ( en las condiciones descritas en el presente método) por 1 ml de producto líquido, o si se trata de un producto deshidratado por 1 ml del producto líquido reconstituido.

### 4 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método se basa en la capacidad de la enzima fosfatasa, de hidrolizar los ésteres fenil-fosfóricos que se adicionan al sustrato de la muestra, liberando fenol, que se puede detectar con reactivos especiales como la dibromo-quinona-cloroimida o el reactivo de Fo-

lin-Ciocalteau, con las cuales se forma un complejo de indofenol azul. La cantidad de fenol liberado es proporcional a la concentración de fosfatasa alcalina presente, y la valoración cuantitativa del mismo se puede hacer por comparación visual o fotométrica con el color obtenido en testigos de fenol de concentración conocida tratados en idénticas condiciones.

NOTA: Todo el material y reactivos a usarse en el ensayo deben estar libre de fenol.

## 5 EQUIPO DE ENSAYO

### 5.1 APARATOS.

- 5.1.1 Balanza analítica con precisión de 0,1 mg.
- 5.1.2 Balanza semianalítica con precisión de 0,1 g.
- 5.1.3 Baño de maría termoregurable o estufa de incubación termoregulada a  $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- 5.1.4 Potenciómetro (medidor de pH).
- 5.1.5 Centrífuga.
- 5.1.6 Gradilla para tubos de ensayo.
- 5.1.7 Matraces aforados de 1000, 500, 250, 100 y 50 ml.
- 5.1.8 Pipetas graduadas de 25, 10, 5 y 1 ml.
- 5.1.9 Pipetas volumétricas de 10, 3, 2 y 1 ml.
- 5.1.10 Agitador de vidrio.
- 5.1.11 Tapones libre de fenol.
- 5.1.12 Tubos de ensayo de 12 x 144 mm y 18 x 150 mm.
- 5.1.13 Frasco gotero de color ámbar para el reactivo C.Q.C.
- 5.1.14 Fuente de luz fluorescente.
- 5.1.15 Licuadaora.

## 5.2 REACTIVOS

### 5.2.1 Solución amortiguadora

#### 5.2.1.1 Composición

Sesquicarbonato de sodio dihidratado

( $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) para análisis .....100 g.

Agua destilada cantidad suficiente para.....1000 ml.

#### 5.2.1.2 Preparación.

Se pesan exactamente 100 g de sesquicarbonato de sodio dihidratado y se disuelven en agua destilada hasta completar el volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

NOTA: Esta solución también puede prepararse a partir de 46,89 g de Carbonato de sodio p.a ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), y 37,17 g de bicarbonato de sodio p.a ( $\text{NaHCO}_3$ ), se disuelven en agua destilada y se lleva a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

### 5.2.2 Solución amortiguadora de control

#### 5.2.2.1 Composición.

Solución amortiguadora (5.2.1) .....25 ml.

Agua destilada, cantidad suficiente para 500 ml.

#### 5.2.2.2. Preparación.

Se miden exactamente con una pipeta 25 ml de la solución amortiguadora y se llevan a volumen con agua destilada en un matraz aforado de 500 ml.

NOTA: Para la determinación de la fosfatasa alcalina en quesos, cremas y suero de mantequilla la solución amortiguadora de control debe prepararse doblemente concentrada, para lo cual se mide 25 ml de solución amortiguadora (5.2.1) y se llevan a un volumen de 250 ml con agua destilada.

### 5.2.3 Solución de sustrato amortiguado

#### 5.2.3.1 Composición.

Fenil fosfato disódico (libre de fenol)

$(C_6H_5Na_2O_4P \cdot 2H_2O)$  para análisis .....0,5 g.

Solución amortiguadora (5.2.1) .....25,0 ml.

Agua destilada cantidad suficiente para 500 ml.

#### 5.2.3.2 Preparación.

Se pesan exactamente 0,5 g de fenil fosfato disódico libre de fenol y se disuelven en agua destilada, se añaden 25 ml de solución amortiguadora(5.2.1), y se diluye hasta volumen con agua destilada en un matraz aforado de 500 ml.

NOTA: Para la determinación de la fosfatasa alcalina en quesos, cremas ácidas y sueros de mantequilla la solución de sustrato debe prepararse doblemente concentrada, para lo cual se disuelven los 0,5 g de fenil fosfato disódico en agua, se adicionan los 25 ml de solución amortiguadora y se lleva sólo a 250 ml con agua destilada.

#### 5.2.4 Reactivo C.Q.C.

##### 5.2.4.1 Composición

2,6 dicloro-quinona-cloroimida ( $C_6H_2Cl_3NO$ ) para análisis, 30 mg.

Metanol ( $CH_3OH$ ) o etanol absoluto ( $CH_3-CH_2OH$ ) para análisis, 10 ml.

##### 5.2.4.2 Preparación.

Se pesan exactamente 30 mg de 2,6 dicloro-quinona-cloroimida y se disuelven en 10 ml de etanol o alcohol absoluto.

NOTA: La solución preparada se debe conservar bajo refrigeración y se debe descartar después de una semana o antes si se oscurece.

#### 5.2.5 Solución Catalizadora.

##### 5.2.5.1 Composición.

Sulfato de cobre pentahidratado: ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), 200 mg para análisis.

Agua destilada cantidad suficiente para 100 ml

### 5.2.5.2 Preparación.

Se pesan exactamente 200 mg de sulfato de cobre pentahidratado y se disuelven en agua destilada, luego se completa a volumen en un matraz aforado de 100 ml.

### 5.2.6 Alcohol n butílico neutralizado.

#### 5.2.6.1 Composición.

Alcohol n butílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) para análisis.

Hidróxido de sodio 0,1N.

Solución indicadora de azul de bromotimol ( $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5$ ).

#### 5.2.6.2 Procedimiento.

Para neutralizar la acidez libre en el alcohol se procede de la siguiente forma:

5.2.6.2.1 Se añade cantidad suficiente de hidróxido de sodio 0,1 N al alcohol n-butílico.

5.2.6.2.2 Para determinar la neutralización, se toma una pequeña cantidad de alcohol y se mezclan con igual cantidad de agua neutralizada, se agita se deja reposar hasta que se separe la capa acuosa y se agregan unas gotas de la solución indicadora de azul de Bromotimol. Un color verde o ligeramente azul indica la neutralidad. También se puede determinar la neutralidad potenciométricamente (5.1.3).

NOTA: El alcohol n-butílico neutralizado también se puede preparar agregando 13 ml de solución amortiguadora (5.2.1) diluída (2,6 ml de solución amortiguadora (5.2.1) + 10,4 ml de agua destilada) por cada litro de alcohol n-butílico, se agita y se conserva bajo refrigeración.

### 5.2.7 Alcohol n butílico al 7,5%.

#### 5.2.7.1 Composición.

Alcohol n-butílico neutralizado (5.2.6)...7,5 ml

Agua destilada 100,0 ml

#### 5.2.7.2 Preparación.

Se miden exactamente 7,5 ml de alcohol n-butílico neutralizado, se transfieren a un matraz aforado de 100 ml y se lleva a volumen con agua destilada.

5.2.8 Fenol anhidro ( $C_6H_5OH$ ) para análisis.

5.2.9 Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,1N.

5.2.10 Cloruro de Cobalto hexahidratado ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) para análisis.

5.2.11 Solución de ácido clorhídrico (HCl) al 1%

5.2.12 Cloruro Férrico hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) para análisis.

5.2.13 Aqua destilada

### 6 MATERIAL A ENSAYAR

6.1 El material a ensayar consiste en una muestra representativa de leche u otros derivados lácteos como crema, derivados achocolatados, helados, quesos, suero de mantequilla, suero de queso, etc.

### 7 CONDICIONES DE ENSAYO

7.1 La prueba de fosfatasa se debe realizar bajo condiciones estrictamente controladas para evitar errores en los resultados, estas condiciones incluyen:

7.1.1 Toma de muestras, verdaderamente representativas del producto (10 ml del producto homogéneo).

7.1.2 Adecuada conservación de las muestras bajo refrigeración, sin llegar a la congelación o mediante un preservativo apropiado (1-3% de cloroformo).

7.1.3 La realización de la prueba, debe hacerse en una atmósfera libre de sustancias fenólicas.

7.1.4 El material de vidrio que se utilice debe estar limpio, libre de residuos de detergentes y de sustancias fenólicas.

7.1.5 Deben usarse tapones libres de fenol.

7.1.6 Todos los reactivos que se utilicen deben estar en buen estado, químicamente puros y en condiciones que garanticen la ausencia de contaminación con sustancias fenólicas.

7.1.7 Para aquellos productos que tengan incorporados trozos de frutas secas, nueces, u otros aditivos de ese tipo es recomendable, eliminar en lo posible estas sustancias antes del análisis.

## 8 PROCEDIMIENTO

### 8.1 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES PATRON DE FENOL

8.1.1 Se pesa 1,000 g de fenol anhidro (5.2.7) y se transfiere a un matraz aforado de 1000 ml, se lleva hasta la señal de aforo con agua destilada y se mezcla; 1 ml de ésta solución contiene 1 mg de fenol.

8.1.2 Se miden con una pipeta volumétrica, 10 ml de la solución anterior (8.1.1) y se transfieren a un matraz aforado de 1000 ml, se lleva a volumen con agua destilada; 1 ml de esta solución contiene 10  $\mu$ g de fenol. Esta solución se rotula como "FENOL I".

8.1.3 Se miden con una pipeta volumétrica 10 ml de la solución "FENOL I" (8.1.2) y se transfiere a un matraz aforado de 50 ml, se lleva a volumen con agua destilada; 1 ml de esta solución contiene 2  $\mu$ g de fenol. Esta solución se rotula como "FENOL II".

8.1.4 A partir de las soluciones de FENOL I (8.1.2) y FENOL II, (8.1.3), se prepara la serie de soluciones patrón en tubos de ensayo, diluyendo las soluciones de fenol en agua destilada según se indica en la Tabla siguiente (TABLA I).

TABLA I  
PREPARACION DE LAS SOLUCIONES PATRON DE FENOL

Concentración en $\mu\text{g}/5\text{ml}$ (o unidades Scharer)	ml de soluciones de fenol (I) o (II)	ml de agua
0,0	0,0 (II)	5,00
1,0	0,50 (II)	4,50
2,0	1,00 (II)	4,00
5,0	2,50 (II)	2,50
10,0	5,00 (II)	0,00
15,0	1,50 (II)	3,50
20,0	2,00 (I)	3,00
25,0	2,50 (I)	2,50

8.1.5 A cada uno de los tubos que contienen las soluciones patrón de fenol, se le adiciona 0,5 ml de solución amortiguadora (5.2.1) y se mezcla.

8.1.6 Inmediatamente se añaden 6 gotas del reactivo CQC, (5.2.4) más 2 gotas de la solución catalizadora (5.2.5).

8.1.7 Se incuban todos los tubos a 40°C en Baño María (5.1.2) durante 5 minutos.

8.1.8 Se sacan los tubos del Baño María, y se enfrían con agua corriente.

8.1.9 A cada uno de los tubos se añaden 3 ml de alcohol n butílico neutralizado (5.2.6), se tapan con tapones libres de fenol y se agitan suavemente por inversión, cuatro veces en semicírculo. No debe

agitarse fuertemente para evitar la formación de una emulsión. Se dejan los tubos en reposo hasta que el extracto butanólico de indofenol se separe. La separación de la fase se puede acelerar por centrifugación.

B.1.10 Una vez separado el extracto butanólico, se transfiere cada extracto con una pipeta sobre tubos de ensayo debidamente rotulados.

B.1.11 Se procede a realizar una nueva extracción con 3 ml de alcohol n butílico neutralizado de la misma forma especificada en B.1.9 y se añade el segundo extracto al primero (en el tubo correspondiente de acuerdo a B.1.10).

B.1.12 Se colocan los diversos tubos con los extractos butanólicos sobre una gradilla para tubos de ensayo, en orden de concentración de fenol ( $\mu\text{g}/5\text{ml}$ ), para hacer posteriormente la comparación visual.

B.1.13 Estas soluciones patrón de fenol obtenidas según el procedimiento descrito, no son estables y por ello deben prepararse diariamente. Se han desarrollado patrones de color estables mezclando soluciones de cloruro de cobalto, sulfato cúprico, cloruro férrico u otras sales. En la tabla II se presentan los volúmenes de las tres soluciones coloreadas que deben mezclarse para la preparación de soluciones patrón estables en medio ácido.

TABLA II  
PREPARACION DE SOLUCIONES PATRON DE COLOR ESTABLES

FENOL $\mu\text{g}/\text{ml}$	ml de soluciones de color		
	azul (a)	Rojo (b)	Amarillo (c)
1,0	0,2	0,35	0,50
2,0	0,5	0,60	0,55
3,5	0,7	0,50	0,50
5,0	1,0	0,75	0,50
7,5	1,5	0,75	0,50
10,0	2,0	1,00	0,25

## a) Solución azul:

Se pesan 300 g de sulfato de cobre pentahidratado (5.2.5.1), se transfieren a un matraz aforado de 1000 ml, se disuelve y se lleva a volumen con solución de ácido clorhídrico al 1% (5.2.11)

## b) Solución Roja:

Se pesan 59,59 g de cloruro de cobalto hexahidratado se transfieren a un matraz aforado de 1000 ml, se disuelve y se lleva a volumen con solución de ácido clorhídrico al 1% (5.2.11)

## c) Solución amarilla:

Se pesan 45,05 g de cloruro férrico hexahidratado se disuelve y se lleva a volumen con solución de ácido clorhídrico al 1% (5.2.11) en un matraz aforado de 1000 ml.

## 8.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

8.2.1 Leches Fluídas . Se homogeneiza bien la leche antes de tomar la muestra para el análisis.

8.2.2 Leche en polvo y otros derivados lácteos en polvo o concentrados (leche evaporada, leche achocolatada etc).

Se reconstituye el producto con agua, a la concentración original de sólidos de la leche y se homogeneiza bien antes de tomar la muestra para el análisis (La reconstitución debe hacerse según las instrucciones dadas por el fabricante).

8.2.3 Quesos: Se pesan 5 g de muestra, se trituran en un mortero o licuadora y se transfieren a tubos de ensayo de 18 x 150 mm, se le añaden 2 ml de solución de alcohol n butílico neutralizado al 7,5% (5.2.7), se mezcla bien con un agitador de vidrio y se añaden 18 ml más de solución de alcohol n butílico neutralizado al 7,5% (5.2.7). Se mezcla bien con el agitador de vidrio, se deja en reposo durante 30 minutos, y del sobrenadante se toma una alícuota de 0,5 ml para el análisis.

8.2.4 Mantequilla. Se funde la mantequilla a una temperatura de 40°C, se mezcla bien y se toman 0,5 ml de muestra con una pipeta, para el análisis.

8.2.5 Cremas, cremas ácidas y sueros, las muestras para análisis de estos productos se preparan homogeneizándolas en una licuadora.

### 8.3 PREPARACION DE LOS CONTROLES PARA EL ANALISIS DE TODAS LAS MUESTRAS.

Los controles se utilizan en el análisis de determinación de la fosfatasa alcalina, para verificar el deterioro o contaminación de los reactivos o ambos; para detectar la presencia de sustancias saborizantes que contengan compuestos fenólicos; para estimar la variación de color del indofenol azul que resulta de la interferencia de materiales coloreados y de las grasas, particularmente cuando hay extracción directa con alcohol butílico y para verificar la posible presencia de fosfatasa microbiana. Los controles que se emplean en el análisis son los siguientes:

8.3.1 Control negativo: Para cada tipo de producto que se esté ensayando debe realizarse paralelamente un control negativo. El control negativo se prepara de la siguiente forma:

8.3.1.1 Se colocan aproximadamente 5 ml o 5 g del producto en un tubo de ensayo, se coloca en el mismo un termómetro, se calienta a 90°C durante 1 minuto, agitando constantemente para asegurar la inactivación completa de la fosfatasa, luego se enfría rápidamente. Después de la preparación de la muestra se procede a realizar el análisis para fosfatasa.

8.3.1.2 Cualquier color que aparezca en el control negativo indica contaminación de los reactivos, tubos o cualquier otro utensilio empleado para el análisis o bien la interferencia de materias coloreadas (o ambas causas).

El control negativo no debe desarrollar el color azul.

8.3.2 Control positivo. El control positivo se utiliza para controlar el funcionamiento apropiado de los reactivos. Un solo control positivo es suficiente para cada serie de muestras ensayadas, y se prepara de la siguiente manera;

8.3.2.1 Se mide 0,1 ml de leche fresca (cruda) y se mezcla con 100 ml de leche previamente calentada a 90°C durante 1 minuto seguido de un rápido enfriamiento.

8.3.2.2 Se realiza el análisis para fosfatasa y el resultado obtenido debe ser positivo.

8.3.3 Control de sustancias interferentes. La vainilla y otros compuestos con estructuras fenólicas pueden estar presentes en productos como leche achocolatada, cremas (presurizadas o batidas) y helados, razón por la cual pueden obtenerse resultados falsos (positivos) al analizar estos productos.

Por otra parte la leche esterilizada y otros productos procesados pueden contener sustancias que debido a las altas temperaturas y a los cortos tiempos del proceso, pueden reaccionar con la fosfatasa y por lo tanto aportar resultados falsos.

Cuando los resultados de los análisis son positivos al ensayar las muestras mencionadas, los análisis deben ser repetidos, utilizando la misma cantidad de muestra pero sustituyendo la solución de sustrato amortiguador (5.2.3) por solución amortiguadora de control (5.2.2) libre de fenil fosfato disódico.

En la ausencia del fenil fosfato disódico, cualquier color azul que aparezca en el control se debe a las sustancias interferentes y no a residuos de fosfatasa alcalina. Sin embargo, si el fenol liberado en el análisis utilizando solución sustrato amortiguador es mayor al fenol equivalente obtenido en el análisis de control de las sustancias interferentes, pueda considerarse que el proceso de pasteurización no ha sido efectivo o que hay contaminación con leche cruda u otros productos sin pasteurizar.

8.3.4 Fosfatasa microbiana. La posibilidad de producción de fosfatasa por microorganismos en la leche y otros productos lácteos, principalmente en cremas, ha sido demostrada. La fosfatasa microbiana es considerada más resistente al calor que la fosfatasa alcalina de la leche y sus productos. La diferenciación entre ambas es posible a través de la siguiente técnica:

8.3.4.1 Si el análisis de la muestra da resultados positivos, se repasteuriza cuidadosamente 5 ml ó 5 g del producto a 62,8°C durante 30 min. En el período de calentamiento se agita la muestra frecuentemente y se mantiene un termómetro sumergido en ella.

Finalmente se enfría y se hacen las pruebas de fosfatasa para la muestra repasteurizada, la muestra original y el control negativo (muestra bien pasteurizada).

8.3.4.2 Si en la muestra repasteurizada no se observa una reducción significativa en la cantidad del fenol obtenido, puede considerarse que el resultado original se debe a la fosfatasa microbiana y por lo tanto el análisis para fosfatasa alcalina debe reportarse como negativo.

#### 8.4 DETERMINACION

8.4.1 Se colocan en una gradilla tubos de ensayo rotulados de la siguiente manera:

8.4.1.1 Muestra problema (por duplicado).

8.4.1.2 Control positivo (para todas las muestras).

8.4.1.3 Control negativo (para todas las muestras).

8.4.1.4 Otros controles:

a) Para leche achocolatada, quesos, helados y otros productos lácteos con sustancias saborizantes, debe hacerse paralelamente con los controles 8.4.1.2 y 8.4.1.3, un control de sustancias interferentes (8.3.3) por cada muestra analizada que dé resultados positivos.

b) Para cremas, mantequillas y quesos, debe hacerse paralelamente con los controles 8.4.1.2 y 8.4.1.3 un control para fosfatasa microbiana (8.3.4) por cada muestra analizada que dé resultados positivos.

8.4.2 Para los análisis de leche, cremas, helados, mantequilla, leches achocolatadas y cualquier otro producto lácteo concentrado previamente reconstituído, se añaden a cada tubo debidamente rotulado 5,0 ml de solución de sustrato amortiguador (5.2.3), y 0,5 ml de la muestra correspondiente a cada tubo, es decir muestra problema y controles (8.3).

Para los análisis de quesos, cremas ácidas y sueros de mantequilla, se añaden a cada tubo debidamente rotulado 5,0 ml de solución sustrato amortiguado doblemente concentrada (5.2.3-b) y 0,5 ml de la muestra correspondiente a cada tubo, es decir muestra problema y controles (8.3).

8.4.3 Se tapan todos los tubos con tapones libres de fenol (5.1.9) y se mezclan sus contenidos por inversión.

8.4.4 Se incuban los tubos en una estufa o baño maría (5.1.2) a  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

8.4.5 Se retiran los tubos de la estufa (o baño maría) y se añade a cada uno de ellos 6 gotas del reactivo CQC (5.2.4) y dos gotas de la solución catalizadora (5.2.5).

8.4.6 Se tapan y se mezclan los tubos por inversión y se incuban nuevamente durante 5 minutos en una estufa (o baño maría) a  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

8.4.7 Se retiran los tubos de la estufa (o baño maría), se enfrían con agua corriente, y se añade a cada uno 3 ml de butanol neutralizado frío (5.2.6).

8.4.8 Se tapan de nuevo los tubos y se extrae el indofenol por inversión suave de los mismos (4 veces en semicírculo).

8.4.9 Se separan los extractos butanólicos de la fase acuosa por centrifugación seguida de decantación y se transfieren mediante pipetas a tubos de ensayo debidamente rotulados (muestra y controles correspondientes).

8.4.10 Se repite la extracción nuevamente con 3 ml de butanol neutralizado (5.2.6) y se combina el segundo extracto con el inicial (8.4.9).

8.4.11 Un color azul en el extracto butanólico de la muestra indica la presencia de fosfatasa alcalina y por consiguiente que el producto no ha sido pasteurizado, o se ha contaminado con productos crudos después del proceso de pasteurización.

## 9 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

9.1 El contenido de fosfatasa alcalina en la muestra, se determina por comparación con los testigos de fenol, haciendo la comparación contra una luz uniforme (5.1.12).

9.2 Los resultados se expresan en unidades Scharer.

1 unidad Scharer =  $1 \mu\text{g}$  de fenol/ml.

9.3 Debe tomarse en cuenta que sólo se emplean 0,5 ml de muestra por lo cual el resultado obtenido en la comparación debe multiplicarse por dos.

9.4 Un valor de 1 ó más unidades Scharer indica una muestra mal pasteurizada o contaminada con leche u otros productos crudos.

A P E N D I C E

## A.1 BIBLIOGRAFIA.

A.1.1 American Public Health Association 1972. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, Thirteenth edition, Pag. 203-209. Washington D.C

## A.2 NOTAS ADICIONALES

A.2.1 La solución amortiguadora de control puede prepararse disolviendo una tableta de BUF-FAX en 50 ml de agua destilada; para quesos, cremas y sueros de mantequilla se disuelve una tableta de BUF-FAX en 25 ml de agua destilada.

A.2.2 La solución de sustrato amortiguado (5.2.3) también puede prepararse disolviendo una tableta de PHOS-PHAX en 50 ml de agua destilada; para quesos, cremas ácidas y sueros de mantequilla se disuelve una tableta de PHOS-PHAX en 25 ml de agua destilada.


A.2.3 El reactivo C.Q.C (5.2.4) opcionalmente puede prepararse disolviendo una tableta de INDOPHAX en 5 ml de metanol; cuando se usen estas tabletas para preparar el reactivo, se debe omitir el uso del catalizador (5.2.5) ya que las mismas contienen además del C.Q.C la sal de cobre, así en 8.1.6 y 8.4.5 se añadirían solo 6 gotas del reactivo C.Q.C preparado a partir de las tabletas de INDOPHAX, sin adición de solución catalizadora.

**COVENIN**  
573-79

**CATEGORIA**  
C

---

**COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES**  
**MINISTERIO DE FOMENTO**  
**Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12**  
Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12  
**CARACAS**

publicación de :   
FONDONORMA

CDU 643:637.127.6

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS  
Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

---