

Presencia de Sacarosa en la Leche

SU INVESTIGACION Y DOSIFICACION RAPIDAS

C. R. CANO MAROTTA

Inspección Municipal - Usina Magallanes

Servicio de Contralor de la Leche, Montevideo (Uruguay)

S U M M A R Y

The possibility of masking the watering of milk by addition of sucrose has been verified.

Known methods for its investigation are theroretically and experimentally reviewed and critically avaluated. A simple and quick test based on Seliwanoff's reaction is then proposed; it enables the detection of as little as 0.1 % sucrose in milk.

Experimental details are given.

A comparative method with standard scales is then proposed for its quick quantitative determination.

Twenty four references.

I. INTRODUCCION

Existe la posibilidad, ya comprobada en nuestro país y en este Servicio por Tomeo Ibarra⁽¹⁾, de enmascarar el aguamiento de la leche mediante la incorporación de sacarosa a ésta.

Nosotros hemos comprobado además que, la cantidad mínima de sacarosa capaz de encubrir algún aguamiento apreciable, es del orden de 1 a 2 gramos por litro de leche aguada.

Pero como esta cantidad de sacarosa sólo permite agregar agua en un porcentaje muy bajo, por lo general la incorporación de este azúcar deberá hacerse en cantidades bastante mayores para que resulte lucrativa tal manipulación dolosa.

Dado que la casi totalidad de la leche que llega a Montevideo se recibe en las Usinas de Pasteurización, la mayor tarea en la represión de este fraude corresponderá a los laboratorios que controlan esa recepción de leche. Y en la elección de una técnica analítica se deberá tener en cuenta el factor tiempo a fin de no entorpecer el trabajo de volcar y pesar el producto que se recibe.

El objeto del presente trabajo es, pues, contribuir a poner de manifiesto esta acción fraudulenta, estudiando las posibilidades de caracterizar y dosificar en forma rápida la sacarosa, cuando está en presencia de cantidades mucho mayores de lactosa, en la leche. Para ello revisamos todas las técnicas ya propuestas con el fin de seleccionar la que resulte más conveniente para el examen rutinario de la leche, de acuerdo al siguiente criterio:

- 1) La técnica debe ofrecer exactitud en sus resultados y permitir la caracterización de la cantidad mínima indicada anteriormente.
- 2) Tiene que ser rápida en su desarrollo.
- 3) Permitir la mayor sencillez en las manipulaciones a realizar.

Luego de este estudio comparativo se proponen las modificaciones a introducir en la técnica clásica de la reacción de Seliwanoff para adaptarla al criterio precedentemente expuesto.

Como la sacarosa no es un componente natural de la leche, la sola comprobación cualitativa de su existencia en ella, basta para que ésta sea pasible de comiso. Pero como en ciertos casos puede resultar de interés establecer también, aunque sea aproximadamente, la entidad del fraude, completamos nuestro trabajo proponiendo un método rápido de dosificación de la sacarosa en la leche, que lo hace aplicable al trabajo corriente en los laboratorios que la controlan al llegar a las Usinas de Pasteurización.

II) CARACTERIZACION DIRECTA DE LA SACAROSA EN PRESENCIA DE LACTOSA

Se han propuesto varias técnicas que permiten caracterizar la sacarosa, aun en presencia de otro azúcar. Estas técnicas son las siguientes:

A) Pictet⁽²⁾ ha estudiado una reacción característica para la sacarosa. Mezclando en frío volúmenes iguales de solución saturada de CuSO_4 en agua y la solución de sacarosa, al cabo de varias horas se depositan critsales de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Esta reacción no la dan las pentosas, hexosas, biosas y triosas comunes e incluso los isómeros sintéticos de la sacarosa. Presenta, sin embargo, el inconveniente de exigir soluciones concentradas de sacarosa y al aplicarse a la investigación en la leche obligaría a una clarificación y concentración previa de ésta.

B) *Sales de Cobalto.* Denigès⁽³⁾ propone realizar la investigación de la sacarosa efectuando la reacción siguiente, debida a Papasogli: A

una solución acuosa de sacarosa, agregar algunas gotas de solución al 5 % de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y luego un ligero exceso de lejía de soda (D. 1,33). Si hay sacarosa el líquido toma un tinte amatista persistente. La lactosa da lugar a un tinte azul fugaz pero, frente a grandes cantidades de ésta, tiene lugar la formación de un precipitado que enmascara la reacción con la sacarosa. Este hecho lo comprobamos experimentalmente usando leches puras y por lo tanto resulta inaplicable en nuestro caso.

C) Existen otros métodos, todos ellos largos y a veces tediosos, que permiten resolver el problema constituido por una mezcla de sacarosa y lactosa. Entre ellos tenemos:

- a) Los que realizan dos determinaciones polarimétricas o sacariométricas en condiciones diferentes (análisis indirecto) y los que combinan una polarimetría o sacarimetría con una determinación del poder reductor. Ambas maneras constituyen procedimientos muy largos y arrojan resultados dudosos cuando la relación entre

$$\frac{(\text{Sacarosa})}{(\text{Lactosa})} < 0,1$$

- b) Otra manera de investigar la sacarosa es el método bioquímico de Bourquelot. Este investigador observó que cuando actúa una enzima sobre un di, tri o tetrasacárido, existe una relación fija entre el cambio del poder reductor y el cambio en la desviación polarimétrica. Esa relación denominada "Índice de reducción enzimolítico (IRE)" permite establecer con seguridad la presencia de sacarosa, rafinosa, estaquiosa, etc.

Este método es de indudable valor, pero su adopción en el examen diario de la leche presenta los inconvenientes propios de toda manipulación larga y cuidadosa.

Como se puede apreciar en lo que acabamos de exponer, los métodos de investigación de la sacarosa por vía directa no reúnen las condiciones de exactitud, rapidez y sencillez necesarias para su adopción en los laboratorios que controlan la recepción de leche.

Veamos entonces la posibilidad de realizar esta investigación por vía indirecta. Para ello vamos a referirnos primero, brevemente, a la constitución química de ambos azúcares y a los productos de descomposición hidrolítica a que dan lugar.

III) CONSTITUCION QUIMICA DE LA LACTOSA Y DE LA SACAROSA

Ambos azúcares están clasificados como biosas o disacáridos. Las biosas están constituidas por la combinación de dos monosas con pérdida de una molécula de agua. La descomposición hidrolítica de las

biosas, por acción de los fermentos o de los ácidos, deja libertad las monosas de que están formadas.

a) *Lactosa*

La lactosa, cuyo nombre atendiendo a su constitución, es d-galactopiranosido-1-4-d-glucopiranosida, da por hidrólisis una molécula de galactosa y una molécula de glucosa. La galactosa es una monosa que presenta un equilibrio entre sus formas furanosa y piranosas, correspondiendo a esta última mayor estabilidad. La glucosa es otra monosa isómera de la anterior y queda bajo una forma piranoide estable.

Estas monosas pertenecen al grupo de las aldosas (con función pseudo-aldehído).

b) *Sacarosa*

La sacarosa, cuyo nombre atendiendo a su constitución, es d-glucopiranosido-1-2-d-fructofuranosido, por hidrólisis da lugar a una molécula de glucosa y una de fructosa o levulosa. La fructosa es una monosa del grupo de las cetosas (con función pseudo-cetona) y presenta un equilibrio entre sus formas furanosa y piranosas. Este equilibrio está desplazado hacia las formas piranoideas, que son más estables.

c) *Velocidad de hidrólisis de la lactosa y de la sacarosa*

Como se sabe, la velocidad de hidrólisis de los azúcares en general depende de las condiciones experimentales bajo las cuales se lleven a cabo. Desde este punto de vista los factores más importantes a tener en cuenta son:

- 1) La reacción del medio.
- 2) La temperatura.

Pero aun, procediendo en iguales condiciones experimentales, la velocidad de hidrólisis de los distintos azúcares no es la misma y es particularmente notable esta diferencia cuando se consideran la lactosa y la sacarosa.

Tanto es así, que ciertos ácidos débiles, tales como el ácido cítrico que hidroliza la sacarosa, no permite una hidrólisis apreciable de la lactosa⁽⁴⁾.

Es evidente que, si se opera en forma conveniente, se pueden diferenciar ambos azúcares porque uno se hidrolizará más rápidamente que el otro. Bastará entonces producir una hidrólisis tal, y luego poner de manifiesto los productos de ella mediante una reacción adecuada.

d) *Los productos de la hidrólisis*

Hemos expresado anteriormente que mientras la lactosa da por hidrólisis *dos aldosas*, la sacarosa da lugar, también por hidrólisis, a *una aldosa* (glucosa) y a *una cetosa* (fructosa).

Este es otro hecho que permite diferenciar indirectamente la sacarosa de la lactosa aun cuando ambas se hayan hidrolizado en forma total.

En efecto, las aldosas y las cetosas, en ciertas condiciones experimentales, se comportan de distinta manera frente a ciertos reactivos. Por ejemplo, frente a algunos ácidos minerales (H_2SO_4 o HCl), ambas se descomponen dando lugar a varios productos, en general iguales para las dos. Pero, la velocidad de esta reacción de descomposición es mucho mayor para las cetosas que para las aldosas. Entre los productos de descomposición tenemos los ácidos fórmico y levulínico y fundamentalmente oximetilfurfurol.

Los productos resultantes del tratamiento por ácidos minerales, por sí solos o frente a otros compuestos químicos, dan lugar a coloraciones que varían entre el rojizo y el violeta.

Ahora bien, cuidando las condiciones experimentales, se pueden diferenciar una cetosa de una aldosa, puesto que la primera va a dar lugar a una reacción coloreada con suma rapidez, mientras que las aldosas demorarán más tiempo o no la dan del todo.

IV) CARACTERIZACION INDIRECTA DE LA SACAROSA EN PRESENCIA DE LACTOSA

La caracterización indirecta de la sacarosa en presencia de lactosa se basa en los hechos que acabamos de citar y en resumen se reduce a:

- 1) Efectuar una hidrólisis de los azúcares, que a los efectos de aumentar su velocidad conviene hacerla en caliente.
- 2) Practicar sobre los productos de la hidrólisis una reacción que permita descubrir la sacarosa originalmente presente.

Las técnicas propuestas para esta caracterización las podemos agrupar como sigue:

a) *Por reacción con el ion molibdato*

Teniendo en cuenta que la lactosa por sí misma no reduce apreciablemente el ion molibdato proveniente, por ejemplo, de un molibdato de amonio, y que la hidrólisis de la sacarosa, empleando ácidos minerales diluídos, es más rápida que la hidrólisis de aquélla, es posible caracterizar la sacarosa caracterizando las monosas a que da lugar su hidrólisis.

Estas monosas reducen el molibdeno del ion molibdato a ion molibdoso de color azul.

El reactivo empleado corrientemente está compuesto por:

Molibdato de amonio	20 g
Acido clorhídrico concentrado	100 "
Agua destilada, c. s. p.	1000 ml

Se mezclan partes iguales de este reactivo y de la sustancia a examinar y se lleva al baño de maría. En caso de estar presente la sacarosa se origina con rapidez un color azul más o menos intenso.

El éxito de esta reacción radicaré en que el proceso hidrolítico no alcance a la lactosa puesto que, en tal caso, las monosas provenientes de ésta darán lugar a una reacción similar a la que acabamos de describir.

b) *Por reacción con ácidos minerales concentrados*

Se utiliza generalmente H_2SO_4 o HCl . Browne y Zerban⁽⁵⁾ recomiendan la siguiente técnica:

A una solución fría de azúcar, se le agregan por las paredes del tubo de ensayos que la contiene, unos mililitros de H_2SO_4 conc. Luego, sin agitar, en la superficie de contacto aparece un color rosado o más oscuro, con rapidez si hay presente alguna cetosa y lentamente o no aparece si hay aldosas.

c) *Por reacción con fenoles y otros compuestos orgánicos*

La reacción anterior adquiere una gran sensibilidad cuando se incorporan ciertas sustancias orgánicas, generalmente fenoles, que dan lugar a productos de condensación con el oximetilfurfurol proveniente de la descomposición de las exosas presentes. Estos compuestos de condensación tienen coloraciones que oscilan entre el rosado y el violeta intenso. Citaremos a continuación las técnicas que aplican estas reacciones:

α y β naftol. El uso de estas sustancias fué propuesto inicialmente por Molisch y la reacción lleva su nombre.

Spencer⁽⁶⁾ propone la siguiente técnica: A dos gotas de la solución a ensayar, agregar 1 ó 2 gotas de solución alcohólica al 10 % o 20 % de α naftol y unos pocos mililitros de H_2SO_4 (exento de HNO_3). Las cetosas dan en frío y en forma instantánea una coloración rojo violeta. Las aldosas demoran en dar esta reacción. Interfieren las sales férricas y cálcicas. Spencer propone al mismo tiempo, el uso de ciertos dispositivos para conservar los reactivos al abrigo del aire y realizar con comodidad los ensayos rutinarios.

Cresol. Se utiliza cresol en solución jabonosa y la reacción no es interferida por las sales de hierro y de calcio pero es menos sensible que la anterior.

Stevens⁽⁷⁾ prepara el reactivo disolviendo 6 gramos de jabón de Castilla en 100 ml de agua y le agrega 15 ml de cresol. Luego calienta y agita hasta homogeneizar. Practica la reacción de la siguiente manera: A 1 ml de solución a ensayar le agrega 5 a 8 gotas de este reactivo, se agita y luego por las paredes 0,5 ml de H_2SO_4 conc. En presencia de cetosas obtiene un color que va del rojo al rojo negro.

Acido pícrico. La reacción que describiremos es debida a Man y lleva su nombre. Berl-Lünge-D'Ans⁽⁸⁾ proponen realizarla como sigue: La solución se hierve con 2 ó 3 gotas de HCl conc., luego se alcaliniza con NaOH o KOH al 10 % y se añaden 2 ó 3 gotas de una solución alcohólica al 5 % de ácido pícrico. Se produce inmediatamente una coloración roja más o menos oscura si hay cetosas y más lentamente si hay aldosas.

Difenoles - Resorcina y floroglucina - Orcina o timol

En estas reacciones se utiliza generalmente resorcina o floroglucina, aunque también se ha intentado, sin mayor ventaja, emplear orcina y timol.

Seliwanoff⁽⁹⁾ en 1887 propuso la reacción que lleva su nombre, utilizando solución de resorcina. Según Denigès conviene adoptar la siguiente técnica: A 2 ml de la solución a examinar, agregar 2 ml de reactivo de Seliwanoff (2 g de resorcina, 100 ml de agua dest. y 0,5 ml H₂SO₄). Agitar y agregar después 2 ml de HCl conc. y dejar 2 minutos en baño de maría en ebullición. En presencia de una cetosa se obtiene un color rojo y hasta un precipitado del mismo color.

Cuando se emplea floroglucina, la técnica es muy similar a la de Seliwanoff aunque también se ha propuesto efectuar primero la hidrólisis y luego de enfriar, agregar solución alcohólica de dicha sustancia. En presencia de cetosas aparece un color rojo.

V) INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA CARACTERIZACION INDIRECTA

a) *Causas de las interferencias*

Ya hemos expresado que son los productos de la hidrólisis por sí mismos o sus derivados, solos o combinados con otros compuestos (en su mayoría compuestos orgánicos), los que dan lugar a las coloraciones que acabamos de citar. Y también que esas mismas coloraciones pueden darse, aunque con distinta velocidad, tanto por la presencia de uno u otro de los azúcares en cuestión.

Como las condiciones experimentales tienen una marcada influencia sobre la velocidad de estas reacciones, no debe extrañar que una temperatura muy elevada, un mayor tiempo de calentamiento o una elevada concentración de ácido puedan dar lugar a coloraciones semejantes, aun en el caso de estar presente solamente la lactosa.

Este hecho es aun más notable si se dan los tres factores al mismo tiempo.

Y este inconveniente para la investigación de sacarosa que ya lo han hecho notar ciertos autores⁽¹⁰⁾ y lo hemos comprobado nosotros, se hace más notable cuando ese azúcar debe caracterizarse en la leche debido a su apreciable contenido en lactosa.

Por lo tanto, frente al problema de proceder a esta investigación en tales condiciones, el éxito dependerá de las condiciones experimentales.

Las técnicas propuestas para evitar alguna interferencia recurren a las soluciones siguientes:

- 1) Impedir o demorar la hidrólisis de la lactosa.
- 2) Si ésta no se puede impedir en forma total, eliminar las aldosas que ese produzcan.
- 3) Si esto no es posible, evitar que tales aldosas reaccionen en forma apreciable.

Vamos a ver cada una de estas soluciones.

1) *Se impide o demora la hidrólisis de la lactosa*

Este aspecto es fundamental cuando el reactivo empleado es el molibdato. Anteriormente hemos dicho que los ácidos débiles prácticamente no hidrolizan la lactosa, y su uso parecería el más adecuado para realizar sólo la hidrólisis de la sacarosa. Sin embargo como su utilización demora también esta hidrólisis y alarga por consiguiente toda la operación, generalmente se prefiere emplear soluciones diluídas de HCl. En estos casos, para evitar en lo posible alguna interferencia de la lactosa, se reduce el tiempo total de calentamiento o la temperatura del baño empleado. Indican proceder así:

D) El Chemical Abstract⁽¹¹⁾ que recoge una técnica propuesta hace muchos años en la que se prescribe operar con un baño de maría a 80°C. Emplea el reactivo citado anteriormente y mezcla en partes iguales con la leche a examinar (corrientemente 10 ml de cada uno). Se aconseja hacer al mismo tiempo un ensayo con leche no sospechada y comparar.

E) Godet y Mur⁽¹²⁾ llevan la mezcla de reactivo y leche a un baño de maría hirviendo, durante 5 minutos. También aconsejan hacer al mismo tiempo una prueba con leche pura. En ambos casos, en presencia de sacarosa aparece un color azul, mientras que la leche pura da lugar a un color verdoso pálido.

2) *Se eliminan las aldosas provenientes de la hidrólisis*

Aprovechando la circunstancia de que en medio alcalino las aldosas son más fáciles de destruir que las cetosas, ya sea por el calor solamente, como por el calor y la oxidación, se han propuesto varias técnicas para eliminarlas, entre las que destacaremos las siguientes:

F) Kruisheer⁽¹³⁾ agrega a 2 ml de la muestra —que no contengan más del 2 % de azúcar— 0,5 ml de NaOH 4N y 2 ml de solución de Iodo 0,1 N. Luego de 3 minutos a la temperatura ambiente, se agregan 4 ml de HCl conc. y 4 ml de CuSO₄ al 25 %. El exceso de iodo se saca con Na₂S₂O₃. Sobre 8 ó 10 ml de la solución resultante se hace la reacción de Seliwanoff.

G) Schlemmer⁽¹⁴⁾ efectúa la destrucción de las aldosas en caliente utilizando un baño de maría a ebullición y fijando la sacarosa al estado de sal de bario. Rothenfusser⁽¹⁴⁾ procede de la misma manera pero agregando además agua oxigenada para hacer más completa la destrucción.

3) *Se impide o demora la descomposición de las aldosas*

Estas técnicas modifican las condiciones de experiencia (acidez, temperatura, tiempo de calentamiento) de manera de hacer más difícil la descomposición de las aldosas (glucosa y galactosa) formadas a raíz de las hidrólisis de la lactosa y la sacarosa, pero permitiendo la descomposición de la fructosa que origina también la hidrólisis de esta última.

Como veremos, muchas de estas técnicas han sido propuestas para el caso concreto de investigar sacarosa en la leche.

H) Riffart y Pyriki⁽¹⁵⁾ proponen la técnica siguiente: 5 ó 10 ml de leche defecada se ponen en un tubo de ensayo con un volumen doble de H_2SO_4 al 70 % y se calienta durante 10 minutos a $54^{\circ}C-56^{\circ}C$. En presencia de sacarosa se obtiene un color caramelo oscuro.

I) Casares López⁽¹⁶⁾ opera como sigue: Agregar 3 ml de HCl conc. a 3 ml de leche y calentar a baño maría hirviendo durante 1 minuto. Si hay sacarosa la muestra queda roja por la formación de clorometilfuraldehído. En ausencia de sacarosa la leche toma un ligero tinte rosado.

J) Pinoff utiliza, en vez de ácido mineral concentrado, una mezcla de 200 ml de H_2SO_4 conc. y 750 ml de alcohol a $90^{\circ}GL$. Según Browne⁽¹⁷⁾ la reacción se efectúa como sigue: Tomar 0,05 g de azúcar, 10 ml. de alcohol-sulfúrico, 4 gotas de α naftol al 5 % en alcohol y calentar en baño de maría hirviendo. Según el autor al minuto se obtiene un color apreciable con la sacarosa, mientras que la lactosa demora 25 ó 30 minutos en darlo.

Se adopta una técnica similar para el uso de resorcina, pero se diluye la mezcla alcohol-sulfúrico con igual volumen de alcohol a $96^{\circ}GL$.

Weehnizen⁽¹⁸⁾ aconseja operar en forma similar pero empleando una mezcla de alcohol y HCl.

K) Foulger⁽¹⁹⁾ propone lo siguiente: Tomar 1 ml de la solución a ensayar, 10 ml de H_2SO_4 al 75 % y 2 gotas de solución alcohólica al 3 % de α naftol. Agitar y llevar al baño de maría a $45^{\circ}C$ durante 20 minutos. Un color rojo indica la presencia de cetosas.

L) Romani⁽²⁰⁾ toma 1 gota de leche, 2 gotas de α naftol al 20 % en solución alcohólica y 3 ml de HCl conc. Se agita y hierve 3 ó 4 segundos. Se enfría y agita con cloroformo. Este se colorea entre amarillo y rojo si hay sacarosa. De lo contrario queda incoloro.

M) Castiglioni⁽²¹⁾ toma 1 ml de leche, 2 gotas de solución alcohólica de resorcina al 40 % y 10 ml de HCl conc. Agita y lleva 5 minutos a un baño de maría a 50°C. Un color rojizo indica presencia de sacarosa.

Esta técnica ha sido empleada en la Inspección Municipal y es recomendada además por Tomeo y Bertullo⁽¹⁾, Ferrerás y Sanz Egaña⁽²²⁾ y recientemente por Rosell y Dos Santos⁽²³⁾.

N) Van der Haar propone usar para 50 mg de azúcar en la toma, 10 ml de HCl y 10 mg de resorcina. Agitar y llevar 15 minutos a baño de maría hirviendo. Un color rojizo indica la presencia de cetosas.

O) Elsdon⁽²⁴⁾ propone operar como sigue: A 15 ml de leche agregar 1 ml de HCl y 0,5 g de resorcina. Mezclar y secar 5 gotas en una capsulita de porcelana al baño de maría. Un color rojo indica la presencia de sacarosa.

P) Shimizu e Iwasa⁽²⁵⁾ practican la investigación sobre leche previamente desproteinizada con solución acuosa al 20 % de ácido sulfosalicílico. Al filtrado obtenido se le agrega HCl diluído y calienta 10 minutos en baño de maría hirviendo. Luego se enfría y se le agrega solución alcohólica al 10 % de floroglucina. Si la leche contiene sacarosa aparece un color rojo más o menos intenso.

Q) Rosell y Dos Santos⁽²³⁾ citan una técnica muy parecida. Primero obtienen suero coagulando la leche con ácido salicílico al 20 % en baño de maría a 50°C. A 5 ml de este suero filtrado agregar 10 ml de HCl (D. 1,18), enfriar y añadir 3 gotas de solución alcohólica al 10 % de floroglucina. Un color rojo indica la presencia de sacarosa en la leche examinada.

VI) DETERMINACIONES EXPERIMENTALES Y JUICIO CRITICO SOBRE LAS TECNICAS QUE ANTECEDEN

Hemos ensayado cuidadosamente las diferentes técnicas ya citadas con el objeto de ver cuáles de ellas se ajustan mejor al criterio que hemos expuesto al iniciar este trabajo. Utilizamos en los ensayos leches puras de diversas calidades, individuales y colectivas. A las muestras utilizadas se les incorporó sacarosa en diversas proporciones, pero referiremos la sensibilidad de las técnicas a la forma con que permitan investigar un agregado mínimo de 1 a 2 gramos, por litro de leche. En todos los casos se hicieron ensayos en blanco empleando la misma leche pura.

Llegamos a las siguientes conclusiones:

a) Las técnicas basadas en la reducción del ion molibdato son las menos sensibles y sólo empiezan a dar alguna indicación útil para agregados de sacarosa superiores a 8 gramos por litro de leche aguada.

b) La adopción de cualquiera de las técnicas que destruyen pre-

viamente las aldosas obliga también a una defecación previa de la leche. Además, si se tiene en cuenta el tiempo que exige la realización de toda la operación, es fácil comprender que no se utilicen para los casos de investigación corrientes.

c) Los mejores resultados se obtienen con las técnicas que impiden en lo posible la hidrólisis de la lactosa y al mismo tiempo evitan la descomposición de las aldosas que se hubieran formado en una hidrólisis parcial de ésta. (Son las técnicas que citamos a partir de la letra H inclusive).

d) Y de ellas, las más sensibles son las que utilizan la reacción de Seliwanoff. Resultan mejores que las que utilizan la reacción de Molisch, quizás debido a la presencia de calcio que quita sensibilidad a éstas, y más cómodas que las que emplean floroglucina, aunque en este caso la sensibilidad sea del mismo orden.

e) La mayor comodidad y sensibilidad de algunas técnicas hace que en algunos casos se obtengan falsos positivos si no se cumple estrictamente con las indicaciones de la técnica empleada.

f) Las que hemos diferenciado con las letras J), M), N) y P) han resultado ser las más aceptables, sobre todo las debidas a Pinoff y Castiglioni, por ser más rápidas que las otras dos, especialmente que la de Van der Haar.

g) La técnica de Pinoff, debido a la dilución y a la presencia de alcohol, cuando se aplica a la leche es la menos sensible de estas cuatro, pero tiene la ventaja de ser la más rápida y cómoda.

h) La técnica de Castiglioni es de una sensibilidad intermedia respecto de las demás. Lo mismo sucede en cuanto al tiempo requerido para cada ensayo. Sin embargo presenta los inconvenientes de obligar a mantener un baño a 50°C y utilizar HCl concentrado. Las molestias que causan los "humos" a que da lugar este ácido concentrado son de todos conocidas y adquieren mayor significación en el ambiente húmedo de las Usinas de Pasteurización. Esto se puede evitar, aunque sólo parcialmente, manteniendo el ácido bajo campana.

i) La técnica de Shimizu e Iwasa da buenos resultados y es sensible, pero resulta muy larga y un poco incómoda, sobre todo por exigir una defecación.

Con el fin de eliminar los inconvenientes apreciados en nuestras determinaciones experimentales y siempre tratando de satisfacer las condiciones de exactitud, sencillez y rapidez en las operaciones, hemos ensayado algunas formas operativas combinando de varias maneras las condiciones experimentales más importantes a los efectos de la exactitud de los resultados, o sea, la acidez, la temperatura del baño y el tiempo de calentamiento, siempre sobre la base de la clásica reacción de Seliwanoff. Llegamos así a la técnica que citamos a continuación.



VI) TECNICA PROPUESTA PARA INVESTIGAR RAPIDAMENTE LA PRESENCIA DE SACAROSA EN LA LECHE

a) *Técnica de la investigación*

En un tubo de ensayos se ponen 1 ml de la leche a examinar, 2 gotas de solución alcohólica al 10 % de resorcina y 3 ml de HCl diluído (2 partes de HCl conc. y 1 parte de agua destilada). Se agita y luego se mantiene en un baño de maría en ebullición durante 1 minuto exactamente, al cabo del cual se retira y observa.

Con leches que contienen por litro 1 a 2 gramos de sacarosa se obtiene un color rojizo nítido. En ausencia de sacarosa permanece sin colorearse la mezcla de leche, ácido y reactivo. Luego de otro minuto a la temperatura ambiente el color se intensifica un poco más en caso de haber sacarosa. En caso contrario, permanece igual o toma un pálido color salmón que no puede confundirse de ninguna manera con el color rojizo de una reacción positiva. Es lógico que con cantidades de sacarosa superiores a las ya citadas el color a que da lugar la reacción descrita es ya un rojo neto.

b) *Detalles sobre la manipulación*

1. Reactivos a emplear

Utilizamos una solución alcohólica al 10 % de resorcina. No conviene preparar este reactivo en grandes cantidades pues con el tiempo se va coloreando por acción del oxígeno del aire. Este inconveniente se puede evitar bastante mediante la adición de 0,5 g de carbón cada 100 ml de solución. Un rato antes de utilizarlo se agita y luego se deja decantar.

También se puede adoptar la idea de Ofner, que consiste en preparar en forma conjunta el HCl diluído y la resorcina. En este caso nosotros proponemos preparar lo siguiente:

Resorcina	4 g
Agua destilada	330 ml
HCl concentrado	660 "
Carbón animal	9 g

Utilizando el reactivo preparado de esta manera, se incorpora de una sola vez la resorcina y el HCl necesarios para la reacción. Se utilizarán también, como ya hemos dicho, 3 ml por cada ensayo. Tiene, sin embargo, el inconveniente de ser de más difícil conservación.

2. Baño utilizado

En nuestro laboratorio utilizamos un baño de maría hecho con un recipiente de latón dentro del cual sumergimos una gradilla, también de latón, destinada a mantener los tubos en posición vertical y

evitar que se entreveren cuando se hacen muchos ensayos a la vez. El nivel del agua en el baño se mantiene a unos 5 cm de altura. Para mantener esa altura constante se sumerge el cuello de un matraz invertido y lleno de agua. Cuando la boca del matraz es de mucho diámetro se cierra con un tapón atravesado por un tubo cuyo extremo exterior se corta en bisel. La boca del mismo se mantiene en el lugar donde se desea que llegue el nivel del agua. Cuando se realicen pocos ensayos por vez, se puede emplear en vez de la vasija de latón citada un simple vaso de Bohemia en cuya parte superior se pone una lámina de latón con 4 ó 5 orificios. A través de ellos se sumergen los tubos de ensayos y el cuello del matraz de nivel.

El baño se calienta y una vez alcanzada la temperatura de ebullición se baja la llama de manera de mantener esa temperatura cercana a 100°C. De esta manera y sin ninguna preocupación especial tendremos pronto en cualquier momento el baño en ebullición con solo aumentar la llama del mechero. Cuando se enfríe el baño a la temperatura ambiente es conveniente, antes de volver a calentarlo, llenar de nuevo el matraz para evitar algún derrame.

Los tubos de ensayos a utilizar conviene que sean más bien altos, de 12 a 20 cm y de 20 a 30 ml de capacidad.

c) *Conclusiones*

Comparando nuestra técnica con las otras cuatro citadas precedentemente [(J), (M), (N) y (P)], hemos encontrado que su empleo es más ventajoso atendiendo al hecho de que nuestra proposición cumple mejor que las otras las condiciones de exactitud, rapidez y sencillez que nos habíamos propuesto. Por lo tanto, nos permitimos recomendar su utilización en el examen rutinario de la leche.

Atendiendo, además, al costo de cada ensayo, nuestra técnica es más económica que las demás, pues no utiliza alcohol y reduce el gasto de HCl a la quinta parte del que se emplea en los otros casos.

VIII) DOSIFICACION RAPIDA DE LA SACAROSA

Al realizar los ensayos ya descritos, utilizando leches que contenían sacarosa en diferentes cantidades, observamos que la intensidad de la coloración que se desarrollaba parecía ser, dentro de ciertos límites, proporcional a la concentración de azúcar agregado.

Molestaba un poco la apreciación de este hecho los grumos blancuzcos (caseína) que quedaban en el líquido resultante del ensayo cualitativo. La presencia de estos grumos, si bien no influía la exactitud de la investigación citada, perturbaba en cambio cualquier intento de dosificación por comparación con muestras tipos.

Habíamos observado que este hecho no se producía cuando utilizábamos las mezclas de HCl y alcohol y sobre todo de H₂SO₄ y alcohol.

Pero mientras esta última daba lugar a coloraciones muy débiles, la primera no conseguía eliminar totalmente los grumos. Por lo tanto decidimos, luego de varios ensayos, utilizar la siguiente mezcla:

Alcohol a 96°GL	740 ml
HCl concentrado	160 "
H ₂ SO ₄ concentrado	100 "

Utilizando 5 ml de esta mezcla, en vez de HCl de los ensayos cualitativos y procediendo de la misma manera que en esos casos, se obtiene un líquido final que aunque no es transparente es, sin embargo, completamente homogéneo y permite efectuar una buena comparación.

Pudimos comprobar entonces que, cantidades de sacarosa comprendidas entre 1 y 5 gramos por litro, daban coloraciones proporcionales a la concentración de ésta en la leche examinada.

Teniendo en cuenta esto y la rapidez del ensayo, decidimos encarar la dosificación del citado azúcar efectuando una comparación con una escala preparada ex-profeso y sometida al mismo tratamiento que la leche a ensayar.

b) *Preparación de la escala de comparación*

1) Se emplea una leche con reacción de sacarosa negativa. Es conveniente que las características de la leche no difieran mucho de las de la muestra a examinar. Aconsejamos comprobar esto en forma rápida mediante el uso de un lactoscopio. Si no se dispone de él, hacer el ensayo de dilución siguiente: La leche tipo, diluída 10 veces su volumen con agua, debe tener una turbidez bastante semejante a la que presenta la leche a examinar, en iguales condiciones. En caso contrario aguar convenientemente la leche testigo.

2) Usamos una solución de sacarosa al 1,0 % conservada con algunos cristales de timol y preferentemente en frío.

3) Tomamos 6 tubos del mismo diámetro y color. En cada uno de los 5 primeros se ponen 1,0 ml de leche testigo y en el sexto tubo 1,0 ml de la leche en examen. A los tubos 1, 2, 3, 4 y 5 les agregamos respectivamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 ml de la solución tipo de sacarosa y se agitan. En caso de no contar con pipetas apropiadas, todas estas medidas se harán incorporando 2 gotas por cada 0,1 ml indicado, utilizando para ello una pipeta chica, común y de punta sana. Es evidente que la escala preparada así corresponde a un contenido en sacarosa que oscila entre 1 g/l para el primer tubo y 5 g/l para el quinto.

Si se desea, se puede ajustar aún más la técnica propuesta, completando a 0,5 ml con agua, el volumen de solución de sacarosa ya agregado y al sexto tubo agregar 0,5 ml de agua destilada.

c) *Técnica de la operación*

En los 6 tubos se practica, al mismo tiempo, la reacción en la forma ya descrita para los ensayos cualitativos, tratando de proceder

con todos los tubos en la forma más similar posible. Debemos recordar que en lugar de utilizar HCl diluído se deberán usar 5,0 ml de la mezcla alcohol-ácido. Si se desea incorporar de una sola vez el alcohol-ácido y la resorcina, bastará disolver 2,5 g de ésta por cada litro de aquella mezcla.

Cumplido el minuto en el baño de maría hirviendo, se retiran los tubos y se compara el sexto con los restantes de la escala para determinar con cuál de ellos coincide. Bastará entonces saber la cantidad de sacarosa que hemos agregado al tubo de la escala cuya coloración coincide con la del sexto tubo para saber la cantidad de azúcar presente en éste, dado que, a igualdad de coloración, habrá igualdad en la concentración de sacarosa.

Si los tubos de la escala se numeran en forma creciente del 1 al 5, según la cantidad de sacarosa agregada, la concentración de sacarosa en la leche examinada, expresada en gramos por litro, será numéricamente igual al del tubo de la escala con el cual resulta comparable.

Cuando la intensidad en la coloración del tubo que contiene la leche en ensayo sea mayor que la del quinto tubo de la escala preparada por nosotros, deberemos hacer una dilución de aquél hasta que sea posible la comparación y tenerla en cuenta a los efectos del cálculo.

Para obtener resultados más exactos, convendrá repetir toda la operación efectuando previamente la dilución necesaria de la leche en cuestión y de igual manera la de la leche testigo.

Utilizando esta sencilla técnica, hemos podido realizar en forma rápida y satisfactoria la dosificación de sacarosa en leches que la contenían hasta una cantidad de 150 y 200 gramos por litro.

RESUMEN

1) Como existe la posibilidad, ya comprobada en la Inspección Municipal de Montevideo, de enmascarar el aguamiento de la leche mediante la incorporación de sacarosa, hemos orientado este trabajo en el sentido de adoptar una técnica exacta, rápida y sencilla que permita la determinación cualitativa y cuantitativa de la sacarosa en la leche.

2) Luego de revisar teórica y experimentalmente las técnicas ya conocidas que permiten esta investigación, hacemos un juicio crítico de las más aceptables.

3) Proponemos por fin una modificación que, basada en la clásica reacción de Seliwanoff, reúne las tres condiciones citadas.

4) Proponemos, además, una técnica que permite realizar una dosificación rápida y satisfactoria de la sacarosa incorporada, siguiendo un procedimiento comparativo y por escalas.

5) Se dan también los detalles de orden experimental que pusimos en práctica durante el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Tomeo Ibarra H. P. y Bertullo W. Rev. Asoc. Ing. Agr., N.º 4, año 1942.
- 2) Pictet A. Chem. Abst. 27, 2136 (1933).
- 3) Denigès-Chelle-Labat. "Précis de Chimie Analytique". Tomo I, pág. 223, 6.ª ed. (1930).
- 4) Savini E. "Caseificio. Il latte e la sua produzione", pág. 51, 2.ª ed. (1946). Noepli edit. Milano.
- 5) Browne & Zerban. "Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis", pág. 658, 3.ª ed. (1941). J. Wiley Sons.
- 6) Spencer I. Ind. Eng. Chem. 15, 593 (1923).
- 7) Stevens P. Ind. Eng. Chem. 15, 363 (1923).
- 8) Berl-Lunge-D'Ans. "Métodos de Análisis Químico Industrial", Tomo II, 1.ª parte, pág. 230 (1945). Ed. Labor.
- 9) Denigès-Chelle-Labat. Obra citada, pág. 222.
- 10) Cheronis N. & Entrikin J. "Semimicro Qualitative Organic Analysis", pág. 127. Ed. Th. Crowell (1947).
- 11) Anónimo. Chem. Abst. 12, 1401 (1918).
- 12) Godet Mur A. "La leche y sus adulteraciones", pág. 222-223, 2.ª ed. S.A.E.T.A. Madrid. (1946).
- 13) Kruisheer N. Bull. Soc. Chim. 52, 1792 (1932).
- 14) Schlemmer, según Browne & Zerban. Obra citada pág. 733. Rothenfusser, Ibid, Ibid.
- 15) Riffart H. & Pyriki C. Chem. Abst. 19, 361 (1925).
- 16) Casares López R. Anales Soc. Españ. fís. y quim. 31, 201 (1933). Chem. Abst. 27, 2502 (1933).
- 17) Browne C. A. "A Handbook of Sugar Analysis", pág. 378 (1912). Wiley Sons.
- 18) Weehnizen F. Chem. Abst. 12, 2029 (1918).
- 19) Foulger N. J. Biol. Chem. 99, 207 (1932).
- 20) Romani G. Chem. Abst. 26, 1878 (1926).
- 21) Castiglioni. Chem. Abst. 27, 1058 (1933).
- 22) Ferreras y Sanz Egaña. "La Inspección Veterinaria de los Mercados, Mataderos y Vaquerías".
- 23) Rosell y Dos Santos. "Métodos Analíticos de Laboratorio Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácteas". Tomo I, pág. 270. Ed. Labor. (1952).
- 24) Elsdon G. D. Analyst 43, 292 (1918). Chem Abst. 12, 2387 (1918).

Nota. — Expreso mi agradecimiento al compañero de la Inspección Municipal, Roberto Torres Larcebó, por la colaboración prestada en la realización de muchas determinaciones experimentales.