

44 — Calcantita	111 — Ilmenita	178 — Tetradimita
45 — Calcedonia	112 — Jadeita	179 — Tetraedrita
46 — Calcosina	113 — Lapiz-lazuli	180 — Titanita
47 — Calcopirita	114 — Leucita	181 — Topacio
48 — Calomelano	115 — Lepidolita	182 — Torbernita
49 — Caolín	116 — Lignito	183 — Tremolita
50 — Carnalita	117 — Limonita	184 — Trona
51 — Casiterita	118 — Lólingita	185 — Turba
52 — Celestita	119 — Magnetita	186 — Turmalina
53 — Cerusita	120 — Malaquita	187 — Turquesa
54 — Cervantita	121 — Manganita	188 — Valentinita
55 — Cinabrio	122 — Marcasita	189 — Vanadinita
56 — Cloantita	123 — Melanterita	190 — Vesuviana
57 — Clorita	124 — Melilita	191 — Wad
58 — Cobre	125 — Mercurio	192 — Wernerita
59 — Covelina	126 — Microclina	193 — Witerita
60 — Cobaltina	127 — Millerita	194 — Wolframio
61 — Córdierita	128 — Mimetesita	195 — Wolsbergita
62 — Corindón	129 — Mirabilita	196 — Wollastonita
63 — Criolita	130 — Mispickel	197 — Wulfenita
64 — Crisocola	131 — Molibdenita	198 — Willemita
65 — Crisotilo	132 — Moscovita	199 — Yeso
66 — Crocoita	133 — Natrolita	200 — Zircon
67 — Cromita	134 — Natron	

637.1:576.8 Leche, bacteriología
637.1:614.31 Leche, control sanitario

Ensayo de la Resazurina en el Control Higiénico de la Leche

DARDO CROTTOGINI

Químico Farmacéutico.

Servicio de Contralor de la Leche, Montevideo.

S U M M A R Y

The theoretical bases for the resazurine test are exposed, as well as its advantages for the sanitary control of milk. Mention is made to experiments carried out at a pasteurization unit.

1) GENERALIDADES

Para que una leche sea declarada pasteurizable, es necesario que responda a toda una serie de exigencias de órdenes distintos, figurando en primer plano, las condiciones higiénicas que ella debe reunir.

La leche cruda posee cierto poder reductor, debido éste, fundamentalmente a la presencia de una enzima de origen glandular —la reductasa— a parte de algunos componentes normales que, como la lactosa, ácido cítrico y vitamina C, favorecen dicho poder reductor.

Esta acción reductora se pone de manifiesto cuando la leche se mezcla con ciertas soluciones de materias colorantes. Esto ocurre normalmente con el producto fresco proveniente de un animal sano, recogido asépticamente.

Si la leche proviniera de un animal enfermo o fuera recogida en condiciones higiénicas deficientes, o simplemente se tratara de

un alimento viejo y no fresco, también reducirá la solución reactivo del colorante, pero, lo hará con mayor intensidad o en menor tiempo. De manera que, colocando un volumen conocido de leche frente a otro también conocido de la solución reactivo de concentración establecida, y midiendo el tiempo de reducción o determinando la intensidad del proceso, se podrán evidenciar algunos defectos de orden higiénico que la leche puede presentar.

Desde que Duclaux constató que leches con tenor bacteriano elevado, reducían las soluciones de algunas materias colorantes con relativa rapidez, se ha generalizado el empleo de la solución acuosa de azul de metileno como reactivo para avaluar indirecta y aproximadamente aquel contenido microbiano. Esta evaluación se efectúa teniendo presente que, cuanto más corto es el tiempo de reducción, mayor será la contaminación.

Si bien la reducción de la solución de azul de metileno no determina con exactitud el número de gérmenes presentes en una leche (cosa que por otra parte no interesa) presta, sin embargo, gran utilidad para, fijando un concepto higiénico de la misma, poder clasificarla, como lo han hecho Barthel y Jensen en los siguientes cuatro clásicos grupos aceptados universalmente:

Grupo	Calidad	Tiempo de Reducción	Contenido de Gérmenes por mililitro
I	Buena	Por lo menos 5 horas y media	Menos de 500.000
II	Mediana	De 2 a 5 horas y media	De 500.000 a 4.000.000
III	Mala	De 20 min. a 2 horas	De 4 a 20 millones
IV	Muy mala	A lo sumo 20 minutos	Más de 20 millones

El uso del azul de metileno ha sido casi exclusivo en nuestro medio, pero es conveniente saber que para realizar esta llamada "Prueba de la Reductasa", pueden ser empleadas otras materias colorantes distintos del azul de metileno; sea el azul de bromotimol, sea el verde de Janus, sea la resazurina.

El empleo de la solución acuosa de esta última sustancia, engendra o crea la determinación práctica conocida bajo la denominación de "Ensayo o Prueba de la Resazurina".

Este colorante sintético no es nuevo; se trata de una oxasina de la que se conocen sus características desde tiempo atrás, y se sabe que la leche en ciertas condiciones actúa sobre su molécula lo que trae aparejado una modificación del tinte original. De acuerdo al tinte final obtenido durante el ensayo, se podrán también clasificar las leches, ya no como lo hacen Barthel y Jensen estableciendo para cada uno de sus grupos un contenido bacteriano aproximado, pero sí, fijando categorías higiénicas de leches (excelente, muy buena, buena, mediana, etc.).

A pesar de que algunos autores (Schern, Messner entre otros) dejan entrever cierta rivalidad existente entre la reducción del azul de metileno y el ensayo de la resazurina, nosotros, siguiendo a Hill, entendemos lo contrario; la prueba de la resazurina no compite con el de la decoloración del azul de metileno, y no compite, porque mientras este último es primordialmente importante para avaluar aproximadamente el contenido bacteriano de una leche, el primero es más sensible a elevados contenidos de células, las que con frecuencia se deben a la presencia de mastitis en el ganado lechero. En definitiva pues, en el orden higiénico son dos ensayos que se complementan.

II) FUNDAMENTO DEL ENSAYO

Si se mezcla leche con una solución acuosa de resazurina y se mantiene el conjunto a temperatura apropiada durante un tiempo conveniente, el color azul original de la mezcla puede virar hacia el malva, rosa, y; en los casos de leches extremadamente pobres, vira hacia el blanco.

Estos cambios de coloración dependen de tres factores fundamentales:

- 1) De la contaminación inicial.
- 2) De la cifra de bacterias desarrolladas durante el periodo de incubación.
- 3) De la tendencia reductora propia de los organismos contenidos en la leche y de algunas anomalías que la caracteriza.

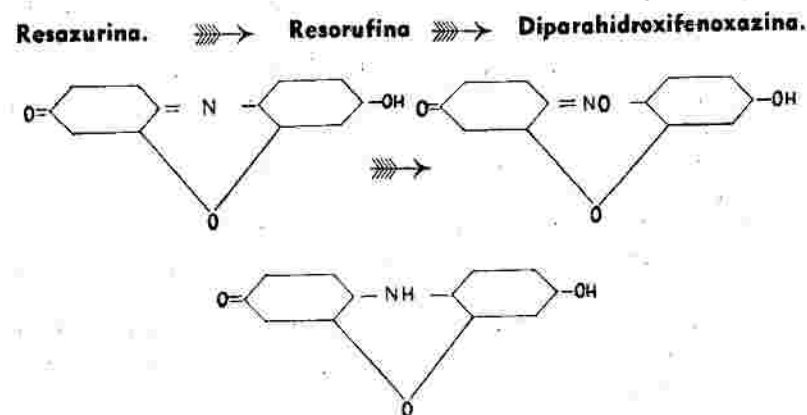
La explicación de los citados cambios radica en que:

- a) La resazurina, de color azul, por reducción parcial pasa a resorufina (color rosa). Este pasaje se efectúa a un $\text{pH} = 6.1-6.2$.

b) La resorufina mediante reducción total pasa a hidrorresorufina. Al transformarse la resorufina en hidrorresorufina, que es incolora, la leche se mantiene blanca.

La hidrorresorufina o sea la hiparahidroxifenoxazina, puede también originarse por reducción directa de la resazurina, es decir, sin pasar previamente por el color que caracteriza a la resorufina.

Esquemáticamente:



Serían estas, las tres etapas límites que representan globalmente el proceso reductor, etapas límites de gran utilidad para medir la calidad higiénica de la leche, pero, entre cada una de estas, es factible obtener tonalidades intermedias (entre el azul y el rosa oscuro es dable observar el tono débilmente malva, malva, malvarosa, y entre el rosa oscuro y el blanco, puede aparecer el rosa pálido).

Estas tonalidades intermedias, que en el fondo no son más que reducciones intermedias, definen también distintas calidades de leches.

Si a cada una de las etapas límites, así como a cada una de las intermedias le corresponde un color determinado y, a este color se le asigna una calidad higiénica establecida, pues, midiendo el color desarrollado durante el ensayo, habremos definido el grupo o clase a que pertenece la leche, conceptuada desde el punto de vista higiénico.

III) TECNICA

Para practicar el ensayo de la resazurina pueden seguirse diversas técnicas las que se distinguen entre sí por la concentración del reactivo a emplear, o por el tiempo de incubación, o por la temperatura a la cual se efectúa dicha incubación.

Nosotros seguiremos aquella que —según Schulz— requiere:

- 1º) Concentración del reactivo: 0.005%.
- 2º) Tiempo de incubación: 10 minutos.
- 3º) Temperatura del baño: 37º.

a) Material necesario.

- 1) Un tintómetro Lovibond.
- 2) El disco de resazurina. Este contiene siete cristales standards; seis de ellos teñidos en colores empíricos que van desde el azul al rosa pasando por el malva y el otro es incoloro.
- 3) Un baño de agua termostáticamente controlado para temperatura de 37º±1.0º.
- 4) Tubos de ensayo de 15 cms. × 1.5 cm. de diámetro marcados a los 10.0 ml. provistos de tapones de goma.
- 5) Pipetas de 1.0 ml.
- 6) Solución de resazurina. Se prepara primeramente una solución madre al 0.05% disolviendo 0.1 g. del producto en 200.00 ml. de agua destilada estéril. Esta solución se conserva en la heladera. Mediante dilución con agua destilada estéril, se prepara la solución al 0.005% que es la que se emplea en el ensayo.

b) Manipulación.

Colocar la muestra bien mezclada y aireada en el tubo de ensayo hasta la señal que marca los 10.0 ml.; añadir 1.0 ml. de la solución reactivo. Tapar el tubo con el tapón de goma, invertirlo un par de veces y colocarlo en el baño de agua a 37º±1.0º durante 10 minutos ± 30". Al término del período de incubación quitar el tubo del baño, invertirlo una o dos veces, secarlo y medir el color desarrollado haciendo uso del tintómetro.

Si no se dispusiera de este aparato, puede emplearse una escala permanente confeccionada con barretas de vidrio coloreadas con los colores standards o en su defecto, usar escalas preparadas con soluciones coloreadas (sales de cobalto, sulfato cúprico).

IV) INTERPRETACION DE RESULTADOS

De acuerdo al color desarrollado las leches se clasifican en las siguientes categorías:

Vidrio color N°	Calidad	Color	Categoría
6	Excelente.	Azul.	A
5	Muy buena	Malva débil.	
4	Buena.	Malva.	
3	Mediana.	Malva-rosa.	B
2	Pobre.	Rosa oscuro.	
1	Mala.	Rosa pálido.	
0	Muy mala.	Blanco.	C

V) PRECAUCIONES

Deberán adoptarse las referentes:

- A la preparación de la muestra.
- Al material.
- A la técnica.
- A la lectura.

1) Preparación de la muestra

Es evidente que si la coloración final obtenida durante el ensayo, depende en primer término, de la contaminación inicial, deberán ser adoptados cuidados extremos para que dicha contaminación sea únicamente la propia de la leche en estudio. Para ello es necesario:

- 1) Extraer la muestra dentro del término de una hora de su llegada a la planta industrializadora.
- 2) Agitar la leche en su envase original durante 5" valiéndose de un cucharón de mango largo el que previamente ha sido lavado con agua fría y luego esterilizado en un baño de agua hirviendo por lo menos durante 1 minuto.
- 3) Extraer la leche que queda por debajo de la superficie y llenar frascos esterilizados de unos 100 ml. de capacidad; taparlos con tapones de goma estériles.

2) Material

Todo aquel material que estará en contacto directo con la leche, deberá previamente ser esterilizado.

- 1) La solución de resazurina al 0.005% deberá ser preparada el mismo día de su uso.
- 2) El interior del baño de agua se mantendrá oscuro y el nivel del agua debe ser tal que se mantenga por arriba del nivel de la leche en el tubo.
- 3) El disco conteniendo los vidrios coloreados estará limpio y seco.

3) Técnica

Cuando se mezcle la muestra con la solución reactivo, deberá flamearse tanto la boca del recipiente que contiene la leche así como la boca del tubo.

4) Lectura

Se tendrán presentes las siguientes observaciones:

- 1) Si el color desarrollado está aproximadamente entre dos números enteros, deberá tomarse la media.
- 2) Si el color es blanco o si la leche presenta una banda superior de color rosa, se le asignará valor cero.
- 3) Si el líquido exhibe un tinte rosa muy pálido o presenta estrías rosa-blancuecinas, se tomará como valor $\frac{1}{2}$ (un medio).
- 4) Leches con alto contenido graso hacen disminuir la intensidad del color azul original. En estos casos no se le asignará valor como indicación de calidad higiénica disminuida.

VI) VENTAJAS QUE OFRECE EL ENSAYO DE LA RESAZURINA

1) Eficiencia

Es una prueba eficiente para medir la calidad higiénica de la leche que permite revelar no sólo la presencia de una mastitis, sino también, los cuidados higiénicos que se han prestado en su obtención. En consecuencia, su aplicación permite:

- a) Seleccionar leches.
- b) Inducir al productor para que mejore su producción.

2) Precisión

a) La resazurina presenta distintas etapas de reducción, lo que facilita la definición más precisa del grupo o categoría a que pertenece la leche.

b) El cambio de resazurina a resorufina es irreversible.

c) El oxígeno no afecta el cambio de resazurina en resorufina.

Esta última condición así como la irreversibilidad manifestada en el primer viraje, permite, en cierto grado, eliminar una causa de error puesta de manifiesto cuando se emplean otros reactivos.

3) Rapidez

Es una prueba absolutamente rápida; requiere solamente una lectura del color desarrollado. De este factor —la rapidez— se derivan dos grandes beneficios:

a) Practicidad. Puede practicarse la prueba de la resazurina en la misma planta de pasteurización sin que su realización interfiera en el trabajo de rutina (determinación de densidad, grasa, sangre, etc.).

b) Dado que el tiempo empleado para la incubación es corto, la flora presente al final del ensayo se aproxima más a la inicial que cuando se practican otros ensayos que requieren tiempos mayores de incubación.

4) Sencillez

Se trata de un ensayo de sencillez absoluta; el mismo idóneo instruido convenientemente, puede practicarlo con seguridad.

5) Indicador de pH

Como ya quedó indicado, el pasaje de resazurina a resorufina se realiza a un pH = 6.1 — 6.2 de manera que en cierto aspecto puede indicar con cierta aproximación el pH de la leche, lo que no deja de ser una ventaja.

6) Recuento de termófilos

Este ensayo apropiadamente modificado (incubación a la temperatura de pasteurización), puede ser aplicado con el fin de efectuar el recuento de termófilos.

VII) NUESTRA EXPERIENCIA

Ha sido mínima; solamente nos hemos limitado a poner en marcha la técnica descrita y realizar —durante el año 1952— ensayos de orientación practicados sobre leches pasteurizadas y crudas que llegan a la planta industrializadora.

Los resultados obtenidos —que no deben ser interpretados como definitivos— nos han indicado que, mientras la leche pasteurizada (63° durante 30 minutos) arroja valores que varían entre los colores malva y débilmente malva, las leches crudas encuadran dentro de la categoría B con tendencia al color rosa oscuro.

Ahora que disponemos de reactivo suficiente, pensamos volver sobre el tema en cuestión, sistematizando el trabajo en tal forma que, analizando cada una de las leches crudas que se reciben en la planta, podamos llegar a formarnos un juicio definitivo acerca de la calidad higiénica que ellas exhiben.

BIBLIOGRAFÍA

- Hill H. "Pasteurisation" Second Ed. 1947. Lewis & Co. London.
Lefèvre L. "Traité des matières colorantes" Tome I. Paris 1896.
Messner E. "El examen de la leche" Biblioteca De Boni. 1934.
Rosell J. M. y Dos Santos I. "Métodos analíticos de laboratorio lactológico y microbiológico de las Industrias lácteas" Ed. Labor 1952.
Savini E. "Chimica e analisi del latte e dei latticini" 2ª Ed. 1946. U. Hoepli Milano.
Schern K. y colaboradores "Capítulos seleccionados sobre higiene moderna de la leche, 2ª Ed. 1936.