

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE ADULTERACIÓN CON
SUERO DE QUESERÍA EN LECHE EXPENDIDA EN LA ZONA
METROPOLITANA DE GUADALAJARA MEDIANTE
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA - SDS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS**

P R E S E N T A :

SILVIA RUVALCABA BARRERA

DIRECTOR:

DR. MVZ. AGUSTÍN RAMÍREZ ÁLVAREZ

ASESORES:

**DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ
DR. RICARDO ALANIZ DE LA O.**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, Julio de 2002



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS COORDINACIÓN DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló la pasante de Maestría en el Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, **M.V.Z. Silvia Ruvalcaba Barrera**, cuyo título es:

"Determinación de la frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche expendida en la zona metropolitana de Guadalajara mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS"

Trabajo dirigido por: **Dr. Agustín Ramírez Álvarez**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 10 Junio del 2002

REVISOR

Dr. Efraín Pérez Torres

REVISOR

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

REVISOR

Dra. Waldina P. Reyes Velazquez

REVISOR

Dr. Hugo Castañeda Vázquez

REVISOR

Dra. Esther Albarrán Rodríguez

c.c.p. Archivo

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONALES:

Universidad de Guadalajara.

Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias.

Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES), Programa Nacional de Superación del Personal Académico (SUPERA).

Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del IMSS.

Lechera Guadalajara, S. A.

CUERPO TUTORIAL:

Dr. MVZ Agustín Ramírez Álvarez.

Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez.

Dr. Ricardo Alaníz de la O.

H. JURADO:

Dra. Esther Albarrán Rodríguez.

Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez.

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda.

Dr. Efraín Pérez Torres.

Dr. Hugo Castañeda Vázquez.

PERSONALES:

M.C. Ma. Del Carmen Yolanda Partida Ortíz.

MVZ Marina Álvarez Cisneros.

MVZ Hector Gabriel Castellanos Orozco.

MVZ Enrique Orozco Amador.

MVZ Joel Mejía Sánchez.

Dios con su omnipotencia dotó a los seres con diferentes aptitudes, a las aves de alas para volar y desplazarse a grandes distancias, a los peces agallas y aletas para subsistir bajo el agua, a las fieras sus garras y velocidad para defenderse y conseguir su alimento.

A mi, como a todos los seres humanos, un cerebro en el que se aloja la inteligencia que me hace pensar, investigar, razonar y aprender; que me permite tomar decisiones, a veces correctas, a veces incorrectas, pero que han forjado mi forma de vida, y me han permitido un desarrollo personal, familiar y profesional.

También me entregó un corazón, en el que se albergan los sentimientos, y con él la capacidad de amar, de perdonar y de agradecer por todos los beneficios recibidos.

Sea pues éste un humilde tributo de amor para quienes me han amado y de agradecimiento para todos aquellos que han sido partícipes de mis triunfos y fracasos, de mis alegrías y sinsabores y del esfuerzo realizado a través del tiempo para la culminación de esta etapa de mi vida profesional.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	ii
ANTECEDENTES	3
Composición y propiedades de la leche	4
Coagulación enzimática de la leche	8
Calidad de la leche	9
Adulteración de la leche	11
Métodos para detección de adulterantes de la leche con suero de quesería	14
Técnica de electroforesis	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Muestreo	24
Preparación de las muestras	25
Corrimiento electroforético	26
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXO	45

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página	
Cuadro 1	Composición general de las proteínas de la leche	8
Cuadro 2	Obtención de muestras	25
Cuadro 3	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche que se expende en la ZMG	30
Cuadro 4	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche industrializada que se expende en la ZMG	30
Cuadro 5	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda que se expende en la ZMG	31
Cuadro 6	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda procedente de centros de acopio	31
Gráfica 1	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche que se expende en ZMG respecto a la época del año	32
Gráfica 2	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche industrializada que se expende en ZMG respecto a la época del año	32
Gráfica 3	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda que se expende en ZMG respecto a la época del año	33
Gráfica 4	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda captada en centros de acopio respecto a la época del año	33
Gráfica 5	Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda adquirida a vendedores ambulantes respecto a la época del año.	34
Figura 1	Coagulación de la leche por renina	8
Figura 3	Fase primaria de la coagulación	9

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche que se expende en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, se efectuó un estudio con 364 muestras recolectadas en los meses de octubre de 1996 a octubre de 1997. Se obtuvieron 169 muestras de leche industrializada (pasteurizada, ultra pasteurizada y deshidratada) en tiendas de autoservicio, y 195 de leche bronca en centros de acopio del estado de Jalisco y expendedores ambulantes. La presencia de suero de quesería se evidenció al identificar un glicomacropéptido característico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Se observó adulteración en el 11.54% de las muestras analizadas, predominando en leche industrializada (16.41%) frente a leche cruda (5.92%); a su vez dentro de las primeras, la leche deshidratada presentó mayor frecuencia (40%). Se identificó suero de quesería en todas las clases de leche y durante la totalidad del periodo de estudio, aunque se observó mayor frecuencia de adulteración en el mes de agosto (21.43%), no se encontró diferencia estadística ($p > 0.05$) entre los meses de muestreo ni se estableció correlación entre frecuencia de adulteración y época del año. Se concluye que durante el periodo de estudio existió adulteración con lactosuero en la leche expendida en la zona metropolitana de Guadalajara.

INTRODUCCIÓN

El consumo de leche representa un gran beneficio para la humanidad, éste radica en su empleo como satisfactor psicológico y nutrimental. La leche es un satisfactor psicológico ya que cubre ciertas necesidades de bienestar en los consumidores, especialmente para la dieta de niños y ancianos. En cuanto al enfoque nutrimental, es un alimento completo que reúne todos los elementos necesarios para una adecuada nutrición.

Sin embargo, cuando la leche no ha sido manejada correctamente puede representar un riesgo, ya que se encuentra expuesta a diferentes tipos de contaminaciones: físicas, químicas y microbiológicas, así como a diversas adulteraciones que se realizan con la finalidad de conservar las propiedades del alimento disminuyendo y encubriendo la alteración normal y algunos defectos en el proceso de obtención y manejo, ó bien el incremento en los volúmenes de venta con el consiguiente beneficio económico, lo cual representa un fraude.

Entre las adulteraciones más comunes destacan la adición de agua, de productos neutralizantes y espesantes, y la adición de suero de quesería ó lactosuero. Para la mayoría de estas adulteraciones existen diversos métodos que permiten su identificación; para el agua, la crioscopia, para los neutralizantes, las pruebas colorimétricas que emplean indicadores de pH, para los espesantes existen métodos enzimáticos y para la identificación de suero de quesería se ha empleado con buenos resultados la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS que se basa en la identificación de un glicomacropéptido (GMP) producido durante la fase primaria de la coagulación de la leche por renina y que no es posible encontrar en la leche a menos que contenga suero adicionado.

Es importante que exista control por parte de los involucrados en el sistema pecuario y comercial para garantizar que la leche llegue al consumidor de óptima calidad, esto es: producida, procesada y manejada correctamente.

ANTECEDENTES

La producción mundial de leche durante el 2001, fue de alrededor de 491 millones de toneladas, 0.82% mayor que en el año 2000, los países que destacan en este ámbito son: Estados Unidos, la India y Rusia, con una aportación de 76, 34 y 32 millones de toneladas respectivamente. En términos generales la producción mundial de leche durante los últimos 5 años ha presentado un incremento promedio del 1.04%, sin embargo algunos países se han esforzado por elevar su producción en dicho período, tal es el caso de Brasil, Argentina, Australia, México y la India, al registrar crecimientos medios anuales de 5.7%, 5.5%, 4.8%, 3.8% y 3.0% respectivamente (Lactodata, 2002).

Con relación a la leche entera en polvo, en los últimos 5 años la producción mundial aumenta a un ritmo sostenido del 3.8% anual, destaca Argentina por su alto índice del 19.3% anual, le siguen en orden de importancia, Australia, China, Reino Unido, Brasil y Francia, con un crecimiento anual de 9.3%, 8.6%, 7.6% y 6.9% respectivamente (Lactodata, 2002).

Respecto al comercio internacional, Nueva Zelanda continúa siendo el principal país con ventas al exterior de leche entera en polvo y el segundo en leche descremada en polvo, al exportar 567 mil toneladas de estos productos durante 1999. México se ubica en el segundo lugar de los países importadores de leche descremada en polvo al adquirir 125 mil toneladas durante el año 2000, y el treceavo lugar en leche entera, importando en el año 2000 alrededor de 35 mil toneladas, el primer lugar lo tiene Brasil al absorber el 22.8% de las ventas totales (SAGARPA, 2001).

En el panorama nacional, México produjo en el 2001 nueve millones y medio de toneladas de leche, con un incremento promedio de 3.81% anual. En orden de importancia, destacan los estados de Jalisco, que aporta el 18% de la producción

nacional, Durango con el 10%, Coahuila 9%, Chihuahua 8%, Guanajuato y Veracruz con el 7% cada uno. En Jalisco sobresale el municipio de San Juan de los Lagos, que de 1999 al 2000 incrementó 3.5 veces su producción, pasando de 60 a 209 millones de litros anuales. También destacan: Lagos de Moreno, Tepetitlán, Encarnación de Díaz y San Miguel el Alto (Lactodata, 2002).

En la industrialización de leche y derivados, en 1999 el INEGI registró una producción de 3,624 millones de litros que representó el 41.1% de la producción de leche fresca nacional. La producción de queso registró un incremento sustancial del 7.5%, al alcanzar 125.6 millones de toneladas.

Del total de las importaciones del sector lechero, el 51.5 % corresponde a las compras de leche y el 48.4% al resto de productos lácteos, sobresalen: quesos, suero de leche en polvo y grasa butírica deshidratada. De 1994 a 1999 se importaron en promedio casi 52 mil toneladas anuales de lactosuero, con valores que oscilaron entre 45 mil toneladas en 1995 y 56 mil toneladas en 1998; este derivado se adquiere en diferentes presentaciones, suero de leche en polvo, suero de leche en polvo con contenido de proteínas, lactosuero concentrado azucarado y otros lactosueros con características no especificadas (Lactodata 2002).

Composición y propiedades de la leche

Biológicamente, la leche es la secreción de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, producida para alimentar a sus crías desde que nacen hasta que pueden comer otros alimentos y valerse por sí mismas. Para el mamífero neonato, más que un alimento es una dieta para los primeros meses de vida, se trata de un alimento extraordinario (Alais, 1991; Keilling y Luquet, 1991).

Desde el punto de vista nutricional, la leche es un líquido secretado por mamíferos hembras, para la alimentación de sus crías, formado por una mezcla compleja de sustancias alimenticias orgánicas e inorgánicas. Contiene agua, carbohidratos, proteínas, sales minerales, grasa, enzimas, vitaminas y gases (Bourgues y Morales, 1986).

A diferencia de otras especies, el hombre para alimentarse, emplea la leche de otros animales (vaca, cabra, burra, camella, búfala, yegua, llama) además de la leche materna (Lerche, 1969; Charley, 1989).

En el Reglamento de control sanitario de productos y servicios de la Secretaría de Salud, leche se define como la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro (SSA, 1999). Aunque como consecuencia de la domesticación, la leche por antonomasia es la de vaca.

Químicamente la leche es uno de los fluidos más complejos que existen, está formada por una mezcla de elementos que consisten en una emulsión de grasas, una dispersión coloidal de proteínas y una solución formada por el azúcar de la leche, la lactosa, disuelta en agua (Walstra y Jenness, 1987; Veisseyre, 1988).

Las propiedades físicas de la leche son varias, su punto de ebullición es a 100.17°C presenta una coloración blanca aporcelanada, cuando es muy rica en grasa presenta una coloración ligeramente crema por los carotenos contenidos, la leche pobre en grasa es ligeramente azulada (Santos, 1987; Alais, 1991).

La leche fresca no tiene olor característico, pero debido a la presencia de la grasa puede captar con mucha facilidad olores del ambiente o del recipiente que la contiene. En cuanto a su sabor, por la lactosa que contiene, la leche es dulce y

neutra, aunque adquiere por contacto sabores a ensilaje, establo, hierbas etc. (Santos, 1987; Veisseyre, 1988).

La leche está formada aproximadamente de 87.5% de agua y 12.5% de sólidos o materia seca total. El agua es un solvente que sirve como medio de soporte para sus componentes sólidos y gaseosos, encontrándose en dos formas: el agua libre que mantiene en solución la mayor parte de lactosa y sales minerales y se extrae de la cuajada como suero, y el agua de enlace, como elemento de cohesión de componentes no solubles (Veisseyre, 1988; Eskin, 1990).

Elementos sólidos constituyentes de la leche.

Carbohidratos

La lactosa representa el 95% de los glúcidos de la leche, posee un bajo poder edulcorante y constituye en promedio el 40% de los sólidos totales. Se encuentra en solución acuosa, es un disacárido formado por glucosa y galactosa, representa del 4.7 al 5.2 % del total de componentes, es el elemento menos variable por lo que es útil para detectar alteraciones en la leche. La lactosa es el sustrato en la fermentación por bacterias lácticas produciendo principalmente ácido láctico (Eskin, 1990; Alais, 1991; Amiot, 1991).

Lípidos

Los lípidos constituyentes de la leche, varían de acuerdo a la raza, con una media de 3.5% en Holstein-Friesian. En la grasa láctea se encuentran principalmente triglicéridos, además de fosfolípidos, cerobrósidios, esteroides y carotenos. La materia grasa se encuentra en la leche en forma de glóbulos esféricos suspendidos en la fase acuosa del suero, en el tamaño de estos glóbulos influye la especie, la raza y el estado de lactación en que se encuentre el animal, siendo más pequeños en leche de cabras

que en la de vaca y en éstas la raza Holstein presenta el menor tamaño (Alais, 1991; Amiot, 1991).

Proteínas

La leche contiene en promedio 3.2% de proteínas, (cuadro 1) el 80% está representado por caseínas, que son fosfoproteínas que se precipitan en la leche por acidificación a pH 4.6 en una temperatura 20°C o por acción enzimática con renina o enzimas semejantes. Esta característica de las caseínas es aprovechada para coagularlas con fines industriales en la elaboración principalmente de quesos y otros derivados. Se clasifican en los grupos: alfa-, beta-, gamma-, y kappa-caseínas.

Proteínas solubles

Las proteínas del suero de la leche son compactas, globulares y solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso ácidos, siempre y cuando no se hayan desnaturizado por el calor). Consta por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la β lactoglobulina, la α lactoalbúmina, la albúmina bovina, inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), y componentes diversos conocidos bajo el nombre de fracción proteosa-peptona (Pérez Gavilán y Pérez Gavilán, 1984; Alais, 1991).

Las proteínas solubles de la leche son en general, termolábiles y en menor grado, sensibles a pH ácido (contrario a las caseínas) debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica; son las primeras proteínas de la leche en desnaturizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial de oxidación-reducción, que puede llegar a inhibir parcialmente las reacciones de oxidación; contienen la mayoría de los aminoácidos y tiene un mejor balance de éstos que las propias caseínas; por lo que su valor nutricional es mejor (Badui, 1989; Alais, 1991).

Cuadro 1. Composición general de las proteínas de la leche

COMPONENTE	CANTIDAD (%)
Proteínas totales	3.25
Caseínas	2.78
Proteínas del suero	0.47
α lactoalbúminas	0.063
β lactoglobulinas	0.251
Inmunoglobulinas	0.51
Seroalbúminas	0.40
Lactoferrinas	0.038
Otras	0.027

Badui, 1989

Coagulación enzimática de la leche.

La leche presenta una característica importante, sus proteínas se coagulan mediante una reacción química ante la presencia de enzimas digestivas como la renina, cuya función fisiológica principal es digerir la leche en el medio ambiente ácido del estómago de rumiantes lactantes y la pepsina en otros animales y en seres humanos (Figura 1). A pesar del pH en el que actúan fisiológicamente, estas enzimas coagulan la leche fresca a pH 6.6 a 6.8 donde sus actividades proteolíticas generales son extremadamente lentas (Alais, 1991).

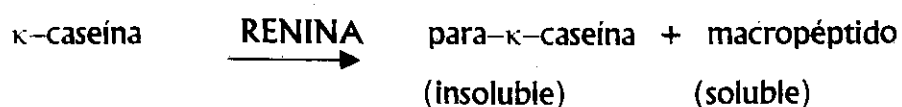


Figura 1. Coagulación de la leche por renina (Alais, 1985)

De acuerdo con Alais (1985), el mecanismo de la coagulación enzimática de la leche ocurre en tres fases distintas. En el curso de la fase primaria, se verifica una proteólisis limitada y específica con el rompimiento del enlace peptídico, muy lábil, entre Fen-Met de la κ -caseína, liberando un gran polipéptido que constituye el lado C-terminal y una proteína residual de baja solubilidad que constituye el lado N-terminal. El polipéptido tiene un marcado carácter hidrófilo. En la segunda fase tiene lugar la formación del coagulo y finalmente, la fase terciaria que se caracteriza por una reacción de proteólisis general, no específica. (Figura 2)

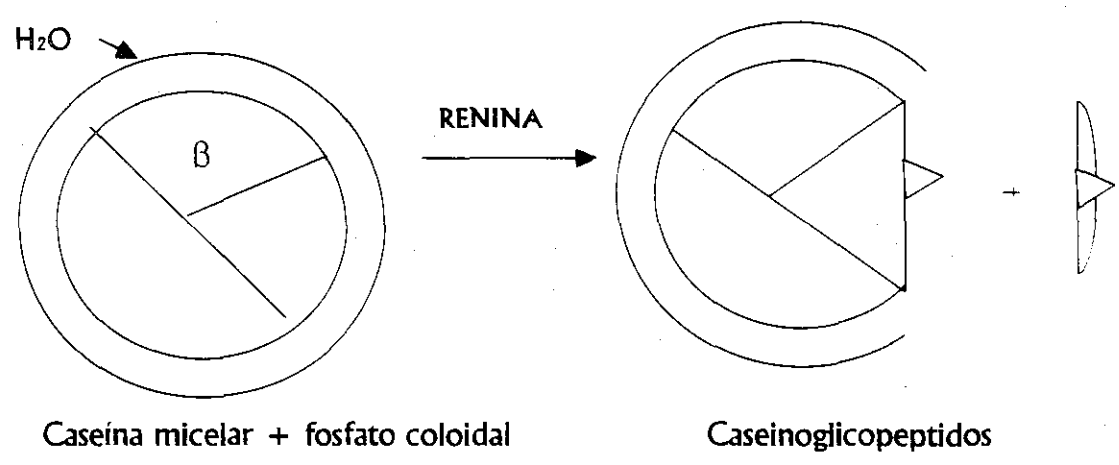


Figura 2. Fase primaria de la coagulación (Alais, 1985)

Calidad de la Leche.

El concepto de calidad es definido por Badui (1988) como el conjunto de propiedades y características inherentes a una cosa que permite apreciarla como igual, mejor ó peor entre las unidades de un producto y la referencia de su misma especie.

Los factores que influyen en la calidad de la leche son: composición, sanidad, apariencia, contaminación y adulteración, y se establece por las disposiciones legales en sanidad y composición así como por la aceptación del consumidor (Ponce, 1994)

En el consumo de la leche existe una dicotomía muy interesante, puesto que representa un beneficio y un riesgo a la vez. Como beneficio significa un satisfactor psicológico y nutrimental; de ahí que las personas ingieran leche porque es sabrosa y altamente nutritiva. Mientras que respecto al riesgo, éste se establece desde dos puntos de vista, el sanitario y el comercial por lo que la leche y los productos lácteos deben llegar de óptima calidad al consumidor, exentos de sustancias nocivas para la salud, inalterados, correctamente denominados y sin adulterar, esto es, producidos, procesados y manejados correctamente (Rosas, 1997).

Los constituyentes lácteos son afectados tanto por la genética como por el medio ambiente. Aproximadamente el 60 % de la variación en la composición de la leche se debe al factor herencia, y el otro 40 % a factores ambientales (Philpot, 1997).

En la sanidad intervienen las cuentas de microorganismos y el conteo de células somáticas, en ocasiones es considerado el factor más importante puesto que ésta puede alterar todas las propiedades de la leche, manifestándose principalmente en cambios de color, olor y sabor (Philpot, 1997).

La ley y reglamentos en materia de salud establecen que un alimento apto para consumo humano debe ser: sano, inocuo, y libre de alteración, contaminación y adulteración (SSA, 1999).

La alteración es un proceso natural en el que intervienen simultáneamente factores microbiológicos, enzimáticos y oxidativos que modifican su composición intrínseca reduciendo su poder nutritivo y cambiando sus características fisicoquímicas y organolépticas hasta rebasar los límites autorizados, pudiendo llegar a ser nocivo para la salud (Badui, 1988).

La descomposición se traduce generalmente en pérdidas económicas, pero el manejo adecuado de los procesos de conservación de alimentos tienden a retrasar este proceso (Casp y Abril, 1999).

Un alimento o materia prima se considera contaminado al contener microorganismos, hormonas, bacteriostáticos, plaguicidas, partículas radioactivas, materia extraña, así como cualquier materia o sustancia en cantidades que rebasen los límites permisibles establecidos por la Secretaría de Salud (SSA, 1994). Los contaminantes están representados principalmente por sedimento, microorganismos, fármacos y plaguicidas.

Se considera un alimento adulterado cuando su naturaleza ó composición no correspondan a aquellas con que se etiqüete anuncie ó expendan, cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización ó bien haya sido objeto de tratamiento que disimule su alteración, contaminación ó encubra defectos en su proceso ó en la calidad de materias primas e ingredientes utilizados. (SSA, 1994). En el concepto de adulteración está implícito el engaño consciente y mal intencionado del productor, industrial y/o comerciante para con el consumidor.

Adulteración en leche.

Ante la globalización y la apertura comercial, el sector lechero debe plantearse estrategias que garanticen la calidad de la leche y los productos lácteos, considerando en particular el aspecto de las adulteraciones, que en países subdesarrollados es un problema frecuente (Salazar, *et al.*, 1992; Martínez y Talamantes, 1998).

La detección de fraudes es difícil y exige mucha atención en los análisis, y en la interpretación de resultados. En la actualidad la disposición de equipo en los centros

de recepción de leche es limitada por los costos y especialización del personal operativo, por lo que se buscan técnicas más accesibles que identifiquen la adulteración en leche cruda que se recibe en la industria de productos lácteos. Las adulteraciones más frecuentes son la adición de agua, seguida en orden de importancia por sacarosa, álcalis, y suero de quesería (Álvarez y Orozco, 1998).

Para la identificación de adulteración por adición de agua (aguado), las técnicas clásicas empleadas han sido la medición del índice de refracción y densidad (peso específico) de la leche. Estos métodos pueden detectar adulteraciones gruesas pero no la adición de un volumen relativamente pequeño de agua, de ahí que el método idóneo para determinar con alta precisión la adición de agua a la leche sea en la actualidad la determinación del índice crioscópico, que mide la temperatura de congelación de la leche. También se emplea la osmometría, que funciona con un principio semejante a la crioscopia (Rodríguez y Chombo, 1998).

La leche se congela a temperaturas más bajas que el agua debido a la concentración de solutos, comúnmente de -0.530 a -560 °H (-0.00189 a -0.00186 °C), y puesto que el agua se congela a 0.000 °C, por consiguiente la adición de agua a la leche implica un incremento en su punto de congelación, es decir lo acerca a 0 °C (SECOFI, 1997).

La adición de agua, comúnmente implica que el adulterador trate de compensar el aguado añadiendo sólidos, el producto más frecuentemente empleado es la sacarosa por su solubilidad, precio y disponibilidad (Álvarez y Orozco, 1998). La presencia de este disacárido se identifica mediante el empleo de resorcinol (indicador), al someter la muestra a ebullición en baño maría se produce una coloración rojo brillante cuya intensidad varía de acuerdo a la cantidad de azúcar añadida a la leche (SECOFI, 1997).

El empleo de álcalis como adulterantes tiene la finalidad de impedir, reducir o neutralizar la acidificación natural que sufre la leche que generalmente presenta una acidez de 1.3 a 1.7 gramos por litro, expresado en ácido láctico. Ésta se debe principalmente a su contenido de caseína (0.05 a 0.08%) y de fosfatos, además del bióxido de carbono (0.01 a 0.02%) citratos (0.01 %) y albúmina (menos del 0.01%) (Rodríguez y Chombo, 1998).

La acidez se mide en base a una titulación alcalimétrica con NaOH, utilizando fenolftaleína como indicador. Cuando transcurre un determinado tiempo sin que la acidez aumente, o cuando se detecten cantidades inferiores a 1.4 gramos de ácido láctico hace sospechar de la presencia de álcalis. (SSA, 1994) Los más comunes son carbonatos, hidróxido de sodio o de calcio y peróxido de hidrógeno. La identificación de álcalis es cualitativa y se realiza adicionando unas gotas de ácido rosólico a la leche, será positiva a álcalis cuando la leche adquiera una tonalidad rojiza.

Aunque poco frecuente por lo simple que resulta su identificación y debido a su baja solubilidad y fácil precipitación, el almidón en forma de féculas y harinas puede ser empleado como adulterante. Su presencia se identifica cuando al adicionar unas gotas de yodo se desarrolla un color azul violeta en la leche (Madrid, 1996).

En lo que respecta a la adulteración con suero de quesería, éste es relativamente difícil de identificar por métodos convencionales, ya que contiene elementos propios de la leche. El lactosuero o suero de quesería es la porción fluida de la leche drenada de la cuajada durante la fabricación de queso, contiene la mitad de los sólidos de la leche original. Es una solución de lactosa al 5% y el 25% de los otros componentes de la leche, entre los que destacan albúminas, globulinas, riboflavina, ácido pantoténico, ácido cítrico y ácido láctico. (Charley, 1989; Amiot, 1991; Veisseyre, 1988). Es empleado como fuente de sólidos lácteos en la industria de la panificación y la

fabricación de productos de la leche como helados, yogur y quesos análogos, entre otros (Madrid, 1981).

La adulteración de la leche con suero de quesería, actualmente se establece mediante la evaluación de los perfiles de proteína procedentes de éste (alfalactoalbúmina y beta lactoglobulina) utilizadas como marcadores moleculares. A partir de este principio se han desarrollado técnicas que involucran la electroforesis capilar (Vallejo y Córdoba, 1998), la electroforesis en gel de poliacrilamida (Casadini, 1987 y Pinto, 1991) y otros métodos que utilizan espectrometría de masas y cromatografía, sin embargo desde la década de los setentas se han implementado diversas técnicas basadas en la cuantificación de la proporción de aminoácidos así como la identificación y medición de otros componentes presentes como lactosa, calcio, fósforo, nitrógeno, ácido siálico y componentes secundarios como el glicomacropéptido resultante de la coagulación enzimática por renina.

Métodos para detección de adulteración de la leche con suero de quesería.

a) Métodos relacionados con la composición de aminoácidos:

Hill y Leary, (1968) utilizaron la diferencia entre el contenido de cisteína + cistina de la caseína y proteínas del suero para estimar cantidades de proteínas del suero agregadas en co-precipitados de caseína mediante análisis amperométrico de los grupos sulfidrilos (SH).

Koning y Van Rooijen, (1971) desarrollaron un método colorimétrico para estimar proteínas del suero en co-precipitados de caseína y mezclas de proteína en suero de leche. El método se basa en la determinación del contenido de cistina como la medida de la cantidad de proteínas del suero presentes en estas preparaciones.

Mrowetz y Klostermeyer (1976) emplearon la medición de la diferencia de cisteína y cistina de la caseína y proteínas del suero para determinar una eventual adición de suero en polvo en la leche en polvo relacionando los grupos SH resultantes con los picos de un polarograma empleando como referencia una solución de metil cloruro de mercurio.

Dill *et al.*, (1986) propusieron un método basado en la concentración total de sulfidrilos (cisteína + medio residuo de cistina) determinadas en una leche en polvo descremada de alto tratamiento térmico.

Greenberg y Dower (1986) diseñaron un método basado en el análisis automático de aminoácidos para detectar concentrado proteico de suero (WCP) agregado en cantidades > 10 % a la leche en polvo descremada siendo el ácido aspártico, alanina y prolina los indicadores de la adulteración.

b) Métodos basados en la relación entre constituyentes

Hemmati y Keeney (1979) utilizaron la técnica de electroforesis de discos en gel de poliacrilamida conteniendo SDS y la HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) para identificar y determinar cuantitativamente suero en polvo como reemplazante de sólidos de la leche en polvo en leches chocolatadas considerando la caseína y la B-lactoglobulina para propósitos cuantitativos.

Otro método basado en la relación fósforo/nitrógeno para la cuantificación de caseínas y proteínas del suero en productos lácteos fue descrito por Douglas *et al.*, (1982)

Solms (1986) consideró la relación caseína/proteínas del suero y caseína/lactosa para detectar una eventual adulteración de la leche en polvo descremada con suero en polvo.

c) Métodos de cuantificación de ácido siálico libre

Warren (1959), describió el método del ácido tiobarbitúrico para la cuantificación del ácido siálico liberado en el sobrenadante luego de la hidrólisis con H_2SO_4 1N del glicomacropéptido precipitado desde una fracción soluble de ácido tricloroacético (TCA) al 12%

Wolfschoon-Pombo y Pinto (1985) propusieron una modificación del método de determinación espectrofotométrica del ácido siálico, al reemplazar el resorcinol por el reactivo de Erlich (basado en el *B*-dimetilaminobenzaldehído)

d) Método crioscópico

Este método fue desarrollado por Castañeda, *et al.*, (1987) y permite estimar mediante una ecuación, el porcentaje de suero en polvo añadido a la leche en polvo con un límite de detección del 2.5%. Es efectivo para mezclas de leche en polvo con suero en polvo desmineralizado o deslactosado.

e) Métodos basados en la determinación glicomacropéptido (GMP)

Koning *et al.*, (1966) propusieron un método para detectar sólidos de suero agregado a la leche en polvo basado en la determinación y cuantificación del glicomacropéptido precipitado con TCA y lavado con etanol y deshidratado.

Josephson *et al.*, (1980), emplearon el método de Koning y Van Rooijen (1971) indicando que un peso seco de glicomacropéptido superior a 55mg/100g de muestra fue indicativo de adulteración de mezclas para postres y helados.

Olieman y Van den Bedem (1983) emplearon un método basado en la estimación del glicomacropéptido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permite detectar niveles de adulteración de hasta un 0.8 % de sólidos totales de suero agregados a la leche en polvo.

Casadini (1987) desarrolló la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para identificar el GMP, resultando un método relativamente simple, menos costoso y complejo que el HPLC y capaz de evidenciar la presencia hasta de un 2 % de suero de quesería en leche pasteurizada y leche en polvo.

Técnica de electroforesis

La palabra electroforesis, proviene de los términos griegos *electro* que significa electrón y *phoresis* que quiere decir traslación. La electroforesis se utiliza para lograr la separación de moléculas al paso de una corriente eléctrica continua y para lograr la migración y separación de moléculas, al aplicar un campo eléctrico. La electroforesis fue usada por primera vez en el año de 1937 por el bioquímico sueco Arne Tiselius (Stryer, 1993).

La técnica, se ha empleado por aproximadamente, 50 años siendo especialmente útil para la caracterización y análisis de polímeros biológicos, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, glucoproteínas y ácidos nucleicos, así como para iones inorgánicos. Estas mismas moléculas poseen grupos ionizables y pueden hacer que existan en disolución en forma de especie con cargas eléctricas, tanto para cationes

(+) como para aniones. (-) Además, las moléculas que tienen cargas similares tendrán distintas relaciones carga/masa debido a diferencias inherentes a su peso molecular, por lo tanto, la migración molecular en un campo eléctrico se ve influenciada por el tamaño, la forma, la carga y la composición química de la molécula (Hillier, 1976; Mathews y Van Holde, 1998).

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS ha sido empleada con buenos resultados para la detección de adulteración con suero de quesería en polvo, en leche pasteurizada y leche en polvo (Urban y *et al.*, 1996) ya que no presenta interferencias en la detección del caseino-macropéptido liberado en el suero, generado por la proteólisis de bacterias psicrotofas en leches enfriadas y permite la detección de niveles superiores al 2% de suero deshidratado tanto en leches frescas como en leche en polvo.

Urbán *et al.*, (1998) reportaron en el análisis realizado en 7 plantas lecheras de la ciudad de México (prueba con duración de cuatro meses) un 82% de muestras de leche en polvo positivas a niveles mayores del 2% de adición de suero de quesería. En el caso de las leches pasteurizadas cuatro de siete marcas comerciales resultaron adulteradas (57.14%).

Cuando se realizó un estudio comparativo de tres métodos (electroforesis capilar, electroforesis capilar con SDS y espectroscopía de absorción con luz ultravioleta) se demostró que los tres métodos fueron efectivos en la identificación de suero de quesería; los resultados mostrados por 21 muestras de leche cruda, 5 de pasteurizada y 18 de ultra pasteurizada, evidenciaron porcentajes de adulteración entre 17.1 a 18.5 en leche cruda, de 16.6 a 18.8 en leche pasteurizada y 16.8 a 17.2 en ultra pasteurizada (Miralles *et al.*, 2000).

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS ha demostrado ser un método confiable y accesible para separar el caseíno macropéptido liberado por acción de la quimosina sobre la K-caseína, (Pinto, 1991) por lo que se consideró el método de elección para la determinación de adulteración con suero de quesería en la leche expendida en la zona metropolitana de Guadalajara.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De la leche disponible a nivel nacional, el 41% se destina a la elaboración de productos lácteos y el 59% al consumo directo como leche fluida, (SAGARPA, 2002) por lo que es necesario que ésta sea de óptima calidad, lo cual obliga a tener mejor manejo y control sanitario de los hatos, programas de pago justo por los industriales y la vigilancia estricta de acuerdo a la normatividad vigente de la autoridad correspondiente sobre los diferentes aspectos que influyen en la calidad de los productos que llegan al consumidor.

Se debe poner especial énfasis en lo referente a los fraudes que se presentan por las adulteraciones, frecuentes en países subdesarrollados, ya que además de problemas económicos traen consecuencias en Salud Pública por la modificación original de la composición de la leche y por consiguiente un empobrecimiento en elementos nutritivos, así como la contaminación potencial por agentes patógenos, comprometiéndose la salud del consumidor.

Por sus características de disponibilidad, costo y difícil identificación, el suero de quesería se incorpora a la leche como adulterante, lo que representa una competencia desleal para los productores y un engaño a los consumidores.

JUSTIFICACIÓN

Los adulterantes más comunes de la leche son el agua, la sacarosa, los álcalis y el suero de quesería, los primeros son relativamente fáciles de identificar por los métodos y equipo disponible en los centros de recepción de leche cruda, lo cual no sucede con el suero de quesería que presenta mayor complejidad química, por lo que se requiere para su detección técnicas instrumentales especializadas para determinar si la leche es auténtica o ha sido adulterada, entre otras, se encuentran la colorimetría, espectrofotometría, cromatografía y electroforesis.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, es una técnica relativamente simple que se basa en la identificación del glicomacropéptido (GMP), producto de la acción enzimática de la renina sobre la K-caseína durante la coagulación de la leche en la fabricación de queso, permite identificar hasta un 2% de suero de quesería adicionado a la leche. Las investigaciones recientes han mostrado resultados favorables al compararse con técnicas de alta precisión y confiabilidad, por lo que su aplicación en la industria lechera, tanto en centros de acopio como en plantas procesadoras proporcionará una herramienta valiosa en el monitoreo de la calidad de la leche.

HIPÓTESIS

El suero de quesería, por su alta disponibilidad, bajo precio y difícil identificación por métodos convencionales se encuentra frecuentemente como adulterante en la leche que se expende en la zona metropolitana de Guadalajara.

OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda e industrializada expandidas en la ZMG, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

PARTICULARES.

1. Identificar la frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda, pasteurizada, ultra pasteurizada y en polvo.
2. Establecer en que época el año es más frecuente la adulteración.

MATERIAL Y MÉTODOS

El proceso experimental se realizó en el Laboratorio de Físicoquímica Alimentaria del Departamento de Salud Pública de la división de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Se empleó un diseño completamente al azar.

La fase experimental se realizó en etapas:

1. Muestreo
2. Preparación de las muestras
3. Corrimiento electroforético

1. MUESTREO

El muestreo se efectuó durante 13 meses, (octubre de 1996 a octubre de 1997). Las muestras de leche cruda se obtuvieron de expendedores ambulantes de la zona metropolitana considerando la entonces división de la ciudad en 4 sectores (Juárez, Reforma, Hidalgo y Libertad) y de 9 centros de acopio localizados en el interior del estado de Jalisco (El Arenal, El Salto, Etzatlán, Jalostotitlán, Jocotepec, Lagos de Moreno, San Juan de los Lagos, Tepatitlán y Zapotlanejo). Las leches pasteurizadas, ultra pasteurizada y en polvo se adquirieron en tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara, considerándose cinco marcas comerciales de las más representativas por su volumen de venta, lo cual se determinó por una encuesta previa, y cuidando que no se repitieran los lotes.

El tamaño de la muestra ($n = 364$) se estableció aplicando la fórmula propuesta por Daniel, (1987) considerando una confianza del 95% y alfa de 0.05 (cuadro 2). La primera semana de cada mes se procesaron muestras de leche cruda y la tercera, muestras de leche industrializada.

Cuadro 2. Obtención de muestras

TIPO DE LECHE	LUGAR DE ADQUISICIÓN	n
Cruda	Vendedores ambulantes	52
	Centros de acopio	117
Industrializada	Pasteurizada	65
	Ultrapasteurizada	65
	En polvo	65

2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Por cada lote de muestras procesadas se prepararon de manera idéntica: una muestra de leche libre de adulteración (control negativo) obtenida directamente de un establo; y otra adicionada con un 5% de lactosuero (control positivo).

A un volumen de 25 ml de leche se le agregó lentamente 12.5 ml de una solución de TCA (ácido tricloroacético) al 24% bajo agitación constante (agitador magnético), la incorporación se realizó en un tiempo de un minuto. Se mantuvieron en reposo por 120 minutos a temperatura ambiente, enseguida el precipitado de caseína y sueroproteínas fue removido por filtración utilizando papel filtro (Whatman No. 5)

A continuación, 15 ml del filtrado fueron transferidos a un tubo de centrifuga (30 ml), y se añadieron 4 ml de una solución de TCA 50%, permanecieron en reposo en refrigeración un mínimo de 12 horas, y luego se centrifugaron a 10,000 rpm (7,000 g) durante 10 minutos. El precipitado fue lavado con 10 ml de una

solución de etanol-éter (1:1), seguido de una nueva centrifugación en condiciones idénticas.

El precipitado se recuperó por resuspensión en 190 μ l de amortiguador 0.05 M TRIS-HCL + 1 ml M EDTA- Na_2 , pH 7.2 y 50 μ l de una solución de sacarosa al 50% conteniendo 0.002% de azul de bromofenol.

Las muestras preparadas se depositaron en viales y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de ser sometidas a la electroforesis.

3. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO

Se empleó la técnica propuesta por Pinto (1991)

El gel se preparó a una concentración del 15 % de la siguiente forma:

Acrilamida 30 % /0,8 Bis	5.00 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.50 ml
Agua destilada	2.33 ml
SDS 10 % (0.1%)	100.00 μ l
PAS 20 % (0.06%)	30.00 μ l
TEMED (0.06)	30.00 μ l

La electroforesis se realizó en el equipo denominado MINIPROTEAN II, (BIO-RAD,^{MR}). Las placas de corrimiento fueron elaboradas con los separadores de 1.5 mm, utilizando peinetas de 10 pozos. En cada pozo se colocaron las muestras que constaron de 50 μ l

El corrimiento se efectuó a 200 v constantes y de 85 a 100 ma durante 40 minutos en un amortiguador de corrida compuesto de tris-glicina pH 8.3

Fijación, tñido y desteñido de los geles

Una vez que se terminó el corrido de las muestras, la cámara fue desarmada en una charola conteniendo agua destilada, para separar los geles sin dañarlos, luego fueron sumergidos en solución fijadora (isopropanol, ácido acético y agua), en una cantidad suficiente para cubrir el gel durante 24 horas.

El tñido se efectuó sumergiendo el gel en una solución de azul de Coomassie durante 90 minutos a temperatura ambiente.

El desteñido se efectuó lavando los geles con agua destilada inmediatamente después del tñido, posteriormente se colocaron en la solución de desteñido, la cual fue removida después de una hora, y posteriormente cada dos horas hasta lograr un contraste nítido.

Se dieron por positivas las muestras en las cuales se apreciaron las bandas de corrido, que fueron de un color azul, comparables con el testigo positivo.

Los resultados fueron organizados en cuadros descriptivos y se aplicó prueba de Ji cuadrada para determinar diferencia estadística en la frecuencia de adulteración con respecto a la época del año.

RESULTADOS

Frecuencia de adulteración con suero de quesería

De las 364 muestras de leche analizadas se encontraron 42 positivas a presencia de lactosuero, lo cual representa un 11.54% de adulteración. El mayor porcentaje corresponde a la leche industrializada, en donde se hallaron 32 muestras positivas, equivalente al 16.41%. En las leches crudas hubo 10 positivas, un 5.92% de adulteración (cuadro 3).

Referente al proceso térmico de industrialización al que fue sometida la leche, se obtuvo mayor frecuencia de adulteración en la leche en polvo, 26 positivas, correspondiendo a un 40%. En leche pasteurizada y ultra pasteurizada, se halló igual frecuencia de adulteración, 3 positivas, equivalentes a un 4.62% (cuadro 4).

La leche cruda captada en centros de acopio, presentó una frecuencia de adulteración con suero de quesería del 2.56%, 3 muestras positivas; y en la procedente de vendedores ambulantes se encontraron 7 positivas, equivalente a un 13.46% (cuadro 5).

En los centros de acopio, se encontraron 2 muestras positivas en Lagos de Moreno y una en Jalostotitlán que representan el 15.38 y 7.69%, respectivamente (cuadro 6).

Frecuencia de adulteración con respecto a los meses de muestreo

Respecto a los meses del año en que se realizó la investigación, se encontró mayor porcentaje de adulteración en el mes de agosto, el 21.43% con 6 muestras positivas. En los meses de julio septiembre y octubre de 1997, hubo un 14.29% que corresponde a 4 muestras positivas. Durante octubre y diciembre de 1996, febrero, marzo, abril y junio de 1997 se determinaron 3 muestras positivas, equivalente a un

10.71%. El menor porcentaje de adulteración se presentó en noviembre de 1996, enero y mayo de 1997 en los cuales se identificaron 2 muestras con presencia de lactosuero, equiparable a un 7.14%. Sin embargo, al realizar una comparación, no se encontró significancia estadística entre los resultados ($p > 0.05$) (gráfica 1).

En leche industrializada hubo adulteración con lactosuero durante todos los meses de la investigación, observándose mayor frecuencia en el mes de agosto con 4 muestras positivas, que representan el 26.67%; en diciembre de 1996, marzo abril y julio de 1997 se hallaron 3 muestras positivas que equivalen al 20%; en el resto de los meses se encontraron 2 muestras positivas, un 13.33% (gráfica 2).

En leche bronca se encontró un 7.69% de presencia de suero de quesería durante los meses de octubre de 1996, febrero, junio y julio de 1997, una muestra en cada mes; y dos muestras positivas, 15.38% en los meses de agosto, septiembre y octubre de 1997. La presencia de lactosuero en leche en polvo fue constante, (40%) durante todo el período de investigación y siempre correspondieron a las mismas marcas comerciales (gráfica 3).

En la de leche de centros de acopio se encontró adulteración con lactosuero durante los meses de agosto, septiembre y octubre de 1997 en una muestra, 11.1% (gráfica 4).

En la leche adquirida de vendedores ambulantes, apareció suero de quesería en una muestra, durante los meses de octubre de 1996, febrero, junio, julio, agosto, septiembre y octubre de 1997 equivalente al 25% (gráfica 5).

Cuadro 3 Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche que se expende en la ZMG

TIPO	N	POSITIVAS	PORCENTAJE
Industrializada	195	32	16.41
Cruda	169	10	5.92
Total	364	42	11.54

Cuadro 4 Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche industrializada que se expende en la ZMG

TIPO	N	POSITIVAS	PORCENTAJE
Pasteurizada	65	3	4.62
Ultra pasteurizada	65	3	4.62
En polvo	65	26	40.00
Total	195	32	16.41

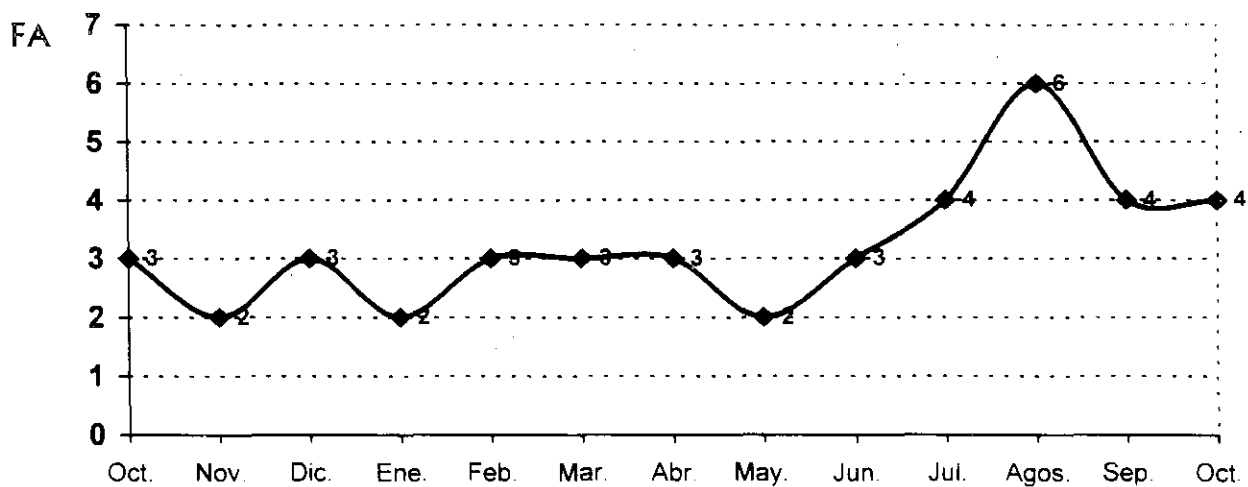
Cuadro 5. Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda que se expende en ZMG

PROCEDENCIA	N	POSITIVAS	PORCENTAJE
Centro de acopio	117	3	2.56
Vendedores ambulantes	52	7	13.46
Total	169	10	5.92

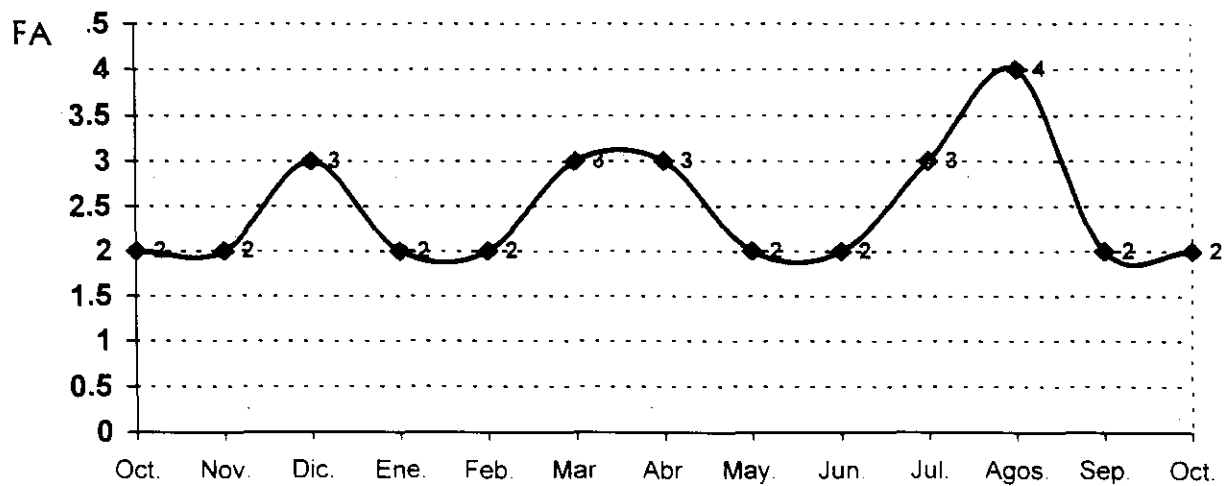
Cuadro 6 Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda procedente de centros de acopio

LOCALIDAD	N	POSITIVAS	PORCENTAJE
El Arenal	13	0	0
El Salto	13	0	0
Etzatlán	13	0	0
Jalostotitlán	13	1	7.69
Jocotepec	13	0	0
Lagos de Moreno	13	2	15.38
San Juan de los Lagos	13	0	0
Tepatitlán	13	0	0
Zapotlanejo	13	0	0

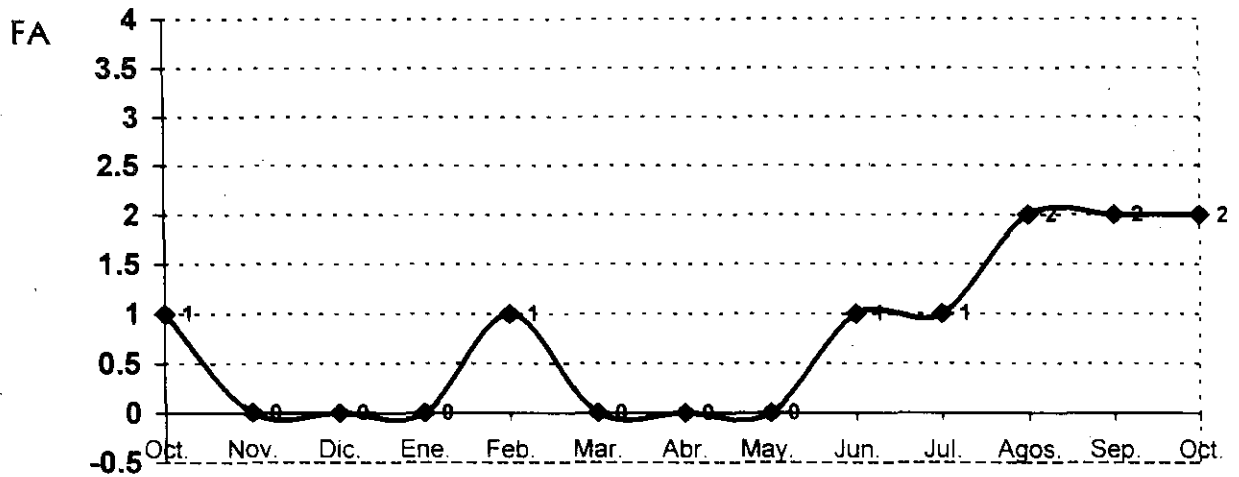
Gráfica 1. Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche que se expende en ZMG respecto a la época del año ($p > 0.05$).



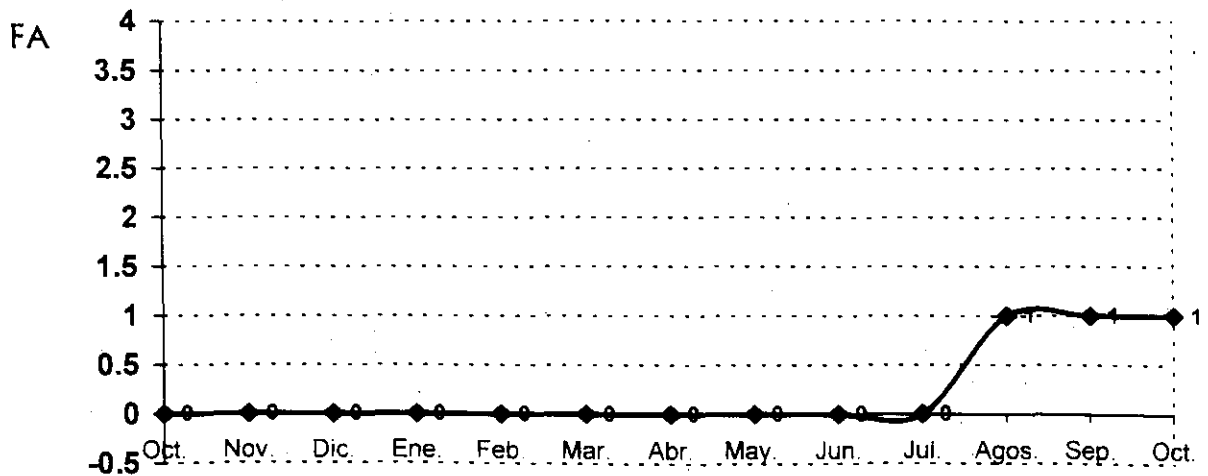
Gráfica 2. Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche industrializada que se expende en ZMG respecto a la época del año ($p > 0.05$).



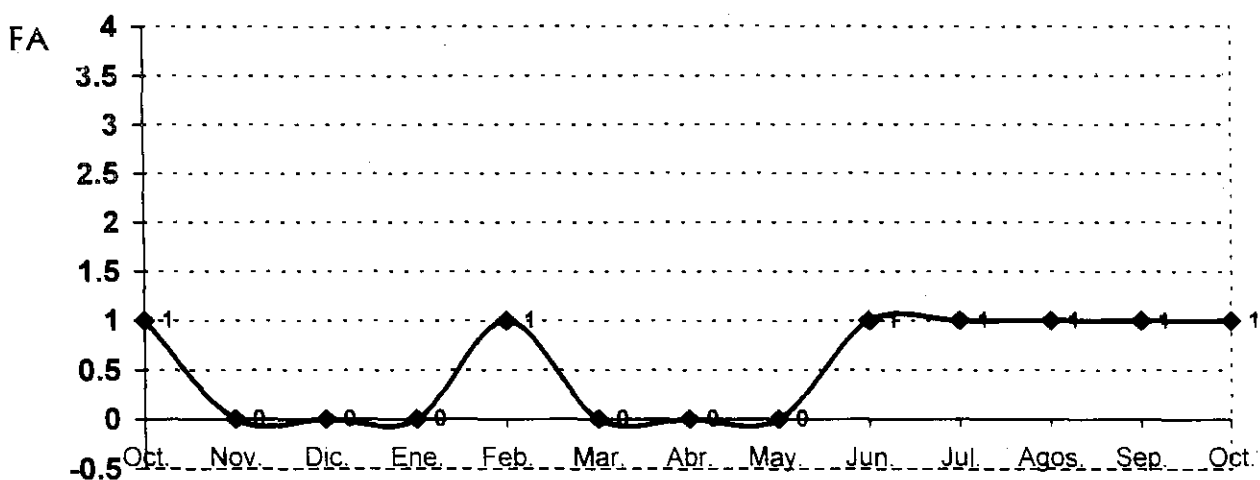
Gráfica 3 Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda que se expende en la ZMG respecto a la época del año ($p > 0.05$)



Gráfica 4. Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda captada en centros de acopio respecto a la época del año ($p > 0.05$)



Gráfica 5. Frecuencia de adulteración con suero de quesería en leche cruda adquirida a vendedores ambulantes respecto a la época del año ($p > 0.05$)



DISCUSIÓN

La presente investigación permitió establecer que el 11.54% de las muestras de leche expendida en la Zona Metropolitana de Guadalajara durante el periodo de estudio presentaron adulteración con suero de quesería.

En leche cruda se presentó adulteración con una frecuencia de 5.92%, en tanto que Miralles *et al.*, (2000) en un estudio realizado en Madrid, España, con la finalidad de evaluar tres técnicas (electroforesis capilar, electroforesis capilar con dodecil sulfato de sodio (SDS) y espectrofotometría con luz ultravioleta) para la identificación de proteínas de suero de quesería en leche encontraron valores entre un 16.8 y 17.2%

Se identificó menor frecuencia de adulteración en la leche obtenida en centros de acopio (2.56%) que en la expendida por vendedores ambulantes (13.75%), esto podría explicarse porque los ganaderos que entregan su producto en los centros de acopio están sujetos a un control estricto para su recepción, mientras que los vendedores ambulantes están totalmente fuera del control de las autoridades, tanto sanitarias como de industria y comercio lo que permite la acción fraudulenta por parte de estos comerciantes en busca de mayor beneficio económico.

De los 9 centros de acopio estudiados, se detectó adulteración en dos de ellos, Lagos de Moreno y Jalostotitlán, municipios del estado de Jalisco que destacan por los elevados volúmenes de producción de leche y caracterizados por la presencia de microempresas dedicadas a la elaboración artesanal de quesos, lo que hace inferir que la mayor disponibilidad del lactosuero facilita su incorporación fraudulenta.

En leche pasteurizada se presentó un 4.62% de adulteración, en tanto que Urbán *et al.*, (1998) en un estudio similar, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS realizado en muestras de leche comercializada en la Ciudad de México identificaron un 57.14%; así mismo Miralles *et al.*, (2000) empleando

electroforesis capilar, electroforesis capilar con SDS y espectroscopía con luz ultravioleta reportaron entre un 16.6 y 18.8%.

A pesar de que la metodología aplicada por Urbán *et al.*, (1998) fue similar, los resultados difieren notoriamente a los encontrados en el presente estudio, lo que puede atribuirse al origen de las muestras, a un menor control de calidad en las plantas receptoras de leche en la Ciudad de México o al manejo de las muestras en el laboratorio.

La adulteración en la leche pasteurizada se presentó en tres marcas comerciales, pero solo en una muestra de cada marca, por lo que se podría inferir que la adulteración se realizó por el productor y ésta no fue detectada por el control de calidad de la empresa pasteurizadora.

De igual forma, en la leche ultra pasteurizada, se identificó la presencia de lactosuero en el 4.62% de las muestras, mientras que Miralles *et al.*, (2000) reportaron entre un 16.8 a 17.2% mediante electroforesis capilar, electroforesis capilar con SDS y espectroscopía con luz ultravioleta.

En este tipo de leche se encontraron tres muestras de la misma marca comercial con presencia de suero de quesería, lo que sugiere que pudo ser responsabilidad de la empresa industrializadora.

Con respecto al estudio realizado por Miralles *et al.*, (2000) en leche pasteurizada y ultra pasteurizada, en el cual compararon diferentes técnicas de identificación (electroforesis capilar, electroforesis capilar con SDS y espectroscopía con luz ultravioleta), éstos demostraron igual eficacia entre sí y resultados que discrepan con los de esta investigación, a pesar de que se realizaron en diferentes condiciones analíticas evidencian que la adulteración con lactosuero en esa ciudad europea no es privativa de países de Latinoamérica.

En referencia a la leche en polvo, la adulteración se presentó en el 40% de las muestras, en tanto que Alcazar *et al.*, (1998) y Urbán *et al.*, (1998) en leche comercializada en la ciudad de México y con metodología similar a la empleada en el presente estudio encontraron el 14.81% y 82% de muestras positivas, respectivamente. Son valores muy diferentes pero que demuestran que este tipo de leche es el más susceptible a ser adulterado, puesto que la apariencia del lactosuero es muy parecida a la de leche en polvo y la mezcla de ellos es relativamente fácil de realizar.

Aunque se esperaba que en épocas de estiaje, la presencia de suero de quesería en la leche fuese mayor, debido a que disminuye la producción y se requiere justificar un cierto volumen de venta, finalmente se observó que fue agosto el mes con mayor frecuencia de adulteración, lo que hace pensar que se aprovechó la época en que aparecen los "excedentes" y en donde se justifica que haya mayor volumen de leche, sin embargo, al hacerse una comparación estadística no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la frecuencia de adulteración con respecto al mes de muestreo.

El empleo de la electroforesis en gel de poliacrilamida en la presente investigación permitió identificar la adulteración por suero de quesería en la leche expendida en la zona metropolitana de Guadalajara durante el periodo de estudio, sin embargo y a pesar de ser una técnica respaldada por estudios previos (Casadini, 1987 y Pinto, 1991) en los que se estableció la sensibilidad de la misma (hasta un 2%), así como lo fácil de realizar y su accesibilidad por el costo del equipo comparado con HPLC, presenta la desventaja de ser cualitativa, por lo que si se requiere la confirmación y cuantificación de muestras identificadas como positivas éstas deberán ser procesadas por una técnica más precisa como HPLC.

Es conveniente que se continúe con estudios complementarios, con un mayor tamaño de muestras y en diferentes cuencas lecheras del país para justificar la aplicación de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como una técnica empleada por los organismos responsables de la evaluación de la calidad de la leche y como parte de los análisis de rutina de las plantas receptoras a fin de controlar las adulteraciones que evidentemente están presentes. También se debe buscar influir ante las instancias adecuadas para que sea considerada como una técnica autorizada en la normatividad vigente.

CONCLUSIONES

1. Durante el período en que se realizó la investigación, se identificó adulteración con suero de quesería en leche cruda e industrializada expendida en la zona metropolitana de Guadalajara en un 11.54%.
2. De acuerdo al presente estudio, la leche en polvo es 6.76 veces más susceptible a la adulteración con suero de quesería que la leche cruda y 8.68 veces más que la pasteurizada y la ultra pasteurizada.
3. La adulteración solo se identificó en 2 de los 9 centros de acopio muestreados, Jalostotitlán y en Lagos de Moreno, Jal.
4. La mayor frecuencia de adulteración con lactosurero se estableció durante la época de lluvias, sin embargo, no se encontró relación entre adulteración y época del año

BIBLIOGRAFÍA

- Alais, Ch. 1985. Ciencia de la leche, Ed. CECSA México. pp. 15-22
- Alcazar, M. C., Jaramillo, A. C., Rosas, R. J., Peña, B. S. 1998. Detección de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada de tres marcas comerciales que se expenden en la ciudad de México. En Memorias del Congreso Panamericano de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Mérida, Yucatán, México, marzo de 1998. pp. 115
- Álvarez, C. M., Orozco, C. H. G. 1998. Determinación de agua, sacarosa, álcalis, féculas y suero de quesería como adulterantes en leche bronca consumida en la Zona Metropolitana de Guadalajara. Tesis de licenciatura de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.
- Amiot, J. 1991. Ciencia y Tecnología de la Leche. Ed. Acribia. España. pp. 5-11, 55, 376-379
- Badui, D. S. 1988. Diccionario de Tecnología de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana, México. pp. 43
- Badui, D. S. 1989. Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. México. pp. 28-42
- Bourgues, H. y Morales de León, J. 1986. La leche y sus derivados en la dieta. Cuadernos de Nutrición. Instituto de la Nutrición, México, 9(4):219-228
- Casadini, V. S. 1987. Detección de Suero de Quesería Agregada a la leche pasteurizada y leche en polvo. Determinación del Glicomacropéptido por Electroforesis. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.
- Casp, V. A. y Abril, R. J. 1999. Procesos de conservación de alimentos. Ed. Mundi-Prensa, España, pp. 41
- Castañeda, R., Fernández, G., Caló, M. y Pasqualini, A. 1987. Cryoscopic method for detection and estimation of rennet whey total solids in whole and skim milk powders. Neth. Milk Dairy J. 41:69-79
- Charley, C. 1989. Principios de Tecnología de Alimentos. Ed. CECSA pp. 45-50

- Daniel, W. W. 1987. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa, México. pp. 198-203
- Dill, S. L., Richter, R. L., Dill, C. W. and Samples, D. R. 1986. A sulfur-based method for detecting the adulteration of non fat dry mil with whey. J. Dairy Sci. 69 Suppl 1;226
- Douglas, F. W. Jr., Tobias, J., Groves, M. L., Farrel, H. M. Jr. and Edmondson, L. F. 1982. Quantitative determination of total protein, casein and whey protein of processed dairy products. J. Dairy Sci. 65:339
- Eskin, M. 1990. Biochemistry of Foods. In Biochemical changes in Raw Foods, Milk. Academic Press, Inc. USA pp. 205-321
- Greenberg, R. y Dower, H. J. 1986. Detection of added whey protein concentrate in non fat dry milk by amino acid analysis. J. of Agric. And Food Chemistry. 34(1):30-32
- Hemmati, P. F. y Keeney, P. G. 1979. Detection and quantification of wey ingrediens in milk chocolate using SDS-gel electrophoresis and HPLC. J. of Food Sci. 44(5):1353-1357
- Hill, R. D. y Leary, 1968. A method for estimating the aproximate content of whey protein in co-precipitate. The Austr. J. Dairy Tech. 23(4):160-161
- Hillier, R. H. 1976. The cuantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. J. Dairy Res. 43(2):259-265
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 1999. Balanza comercial de productos lácteos, 1994-1999. www.sagar.gob.mx/cea.
- Josephson, R. V., Holloway-Thomas D. J. and Warthesen, J. J. 1980. Cheese whey detection in frosen desserts. J. Dairy Sci. 63:1356-1360
- Keilling, F. M. y Luquet, R. 1991. Leche y Productos Lácteos. Ed. Acribia, España. pp. 331-333
- Koning, P. J., Elisses, J. and Vries, A. 1966. A method for the detection of small percentages of whey powder in milk powder. Neth. Milk dairy J. 20:204-212
- Koning, P. J. and Van Rooijen, P. J. 1971. Estimation of whey proteins in casein co-precipitate in mixtures with milk powder by the use of a modified ninhydrin reaction. Milchwissenschaft 26(1):1-6

- Lactodata, 2002. Sector lechero. Estadísticas básicas. www.brinkster27/lactodata06
- Lerche, M. 1969. Inspección Veterinaria de la Leche. Ed. Acribia, España. pp. 18-19
- Madrid, L. 1981. Modernas técnicas de aprovechamiento de lactosuero. Ed. Irigara. España. pp. 234-237
- Madrid, V. A. 1996. Identificación de féculas, (Método comparativo) en: Curso de industrias lácteas, Ed. AMV y Mundi-Prensa. España. pp. 496
- Martínez, D. y Talamantes, A. 1998. Anomalías en doce marcas de leche. En: Diario "Público", Guadalajara, Jal., México. 04-25-98
- Mathews, Ch, and Van Holde, K. E. 1998. Bioquímica, segunda edición. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. España. pp. 56-60
- Miralles, B., Bartolomé, B., Amigo, L. y Ramos, M. 2000. Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. J. Dairy Sci. 83(12):2759-65
- Mrowetz, G. and Klostermeyer, H. 1976. Polarographische bestimmung des molken proteinanteiles in milchpulvern. Milchwissenschaft 31(6):346-349
- Olieman, C. y Beden Van Den, J. W. 1983. A sensitive HPLC method of detecting an estimating rennet whey total solids in skim milk powder. Neth. Milk Dairy. 37:27-36
- Pérez Gavilán, E. J. y Pérez Gavilán, E. J. P. 1984. Bioquímica y microbiología de la leche Ed. Limusa, México. pp. 46-49
- Philpot, W. N. 1997. Calidad de la leche y control de la mastitis, en memorias del Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 30 y 31 de mayo, León, Guanajuato, México.
- Pinto, C. M. 1991. Detección de Sólidos totales de Suero de Quesería en leche Pasteurizada y leche en Polvo por Electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS. Alimentos No. 3 Vol. 16 pp. 23-31
- Ponce, C. P. 1994. Calidad de la leche y su control, una problemática nacional en: Sanidad Agropecuaria vol. V, SAGARPA, México, pp. 44-46

- Rodríguez, G. G. y Chombo, M. P. 1998. Los rejugos de poder. Globalización y cadenas agroindustriales de la leche en Occidente. Ed. CIESAS, México. pp. 159-165
- Rosas, R. J. 1997. Adulteración y calidad de la leche en: Memorias del curso taller de Contaminación y Adulteración de la Leche en el Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche, León Guanajuato, México.
- Salazar, C. A., Merinardi, C. A. y Palma, S. 1992. Las adulteraciones de la leche en polvo para consumo humano. Revista Argentina de Lactología. 46:57-62
- Santos, M. A. 1987. Leche y sus derivados. Ed. Trillas, México, pp.33-45.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación 2000. Centro de estadística Agropecuaria, Boletín bimestral. Leche de bovino, enero-febrero, pp. 42-48
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación 2001. Centro de estadística Agropecuaria, Boletín bimestral. Leche de bovino, septiembre-octubre, pp. 56-62
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1997. NMX-F-026,1997-SCFI Leche, denominaciones, especificaciones comerciales y métodos de prueba. pp. 12-13
- Secretaría de Salud, 1994 NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. pp. 17
- Secretaría de Salud. Diario oficial de la Federación, 1999. Reglamento de control sanitario de productos y servicios. México. pp. 6-8
- Stryer, L. 1993. Bioquímica. Ed. Reverté. Tercera edición. España pp. 43-67
- Solms, D. G. 1986. Differentiation of dried whey of different origin and manufacture by chimco-analytical means. Dairy Science Abstract 3 (11) N° 4021
- Urbán, C. G., Pérez, F. N., Pérez, R. J., Fresan, O. C., Prado, F. G., González, C. C., Ramírez, A. A., Vega y L. S., y Pinto, M. 1996. Electroforesis en gel de poliácridamida-SDS para la detección de alteración con suero de quesería en polvo, en leche pasteurizada y leche en polvo. Memorias del III taller internacional sobre calidad de la leche; Valdivia, Chile, octubre 9-11 de 1996 pp. 81

- Urbán, C. G., Pérez, F. N., Vega y L. S., Fresan, O. C., Pérez, R. J., Prado, F. G., González, L. M., González, C. C., Ramírez, A. A., Pinto, C. M 1998. Separación por electroforesis (Page-SDS) del caseinomacropéptido liberado por quimosina sobre la κ -caseína. Efecto de proteólisis por bacterias psicrótofas. *Agro Sur*. 26(2):110-120
- Vallejo, G. B. y Córdoba, M. 1998. A chemometric approach to the detection of milk adulteration based on protein profiles determined by capillary electrophoresis. *J. Capillary Electrophor* May-Aug;5(3-4):133-7
- Veisseyre, R. 1988. *Lactología Técnica*. Ed. Acribia. España, Segunda Edición, pp. 1-20, 47, 50
- Walstra, P. y Jenness, R. 1987. *Química y Física Lactológica*. Ed. Acribia. España. pp. 422
- Warren, L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J. biol. Chem.* 234:1971
- Wolfschoon-Pombo, A. F. and Pinto, C. M. 1985. A quantitative method for the detection of rennet whey in milk. *Cienc. Techol. Aliment.* 5:11-115

ANEXO

REACTIVOS

- Persulfato de amonio (Bio-Rad)
- Acido tricloroacético (Merck)
- Dodecil hidrógeno sulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad)
- Azul brillante de Coomassie (Bio-Rad)
- Glicina (Bio-Rad)
- Tris (Merck)
- Acrilamida (Bio-Rad)
- N'N' – Metileno bis acrilamida (Bio-Rad)
- N-N, N',N'-Tetrametil-etileno-diamino (Temed), (Bio-Rad)
- Ac. Etilendinitrilotetraacético, Sal disódica dihidrato (EDTA-Na₂) (Merck)
- Sacarosa (J. T. Baker)
- Ac. Acético glacial (J. T. Baker)
- 2-Propanol (J. T. Baker)
- Azul de Bromofenol (Merck)
- Metanol (Merck)

MATERIAL

- Equipo para electroforesis Mini Protean II Slab Cel marca Bio-Rad
- Fuente de poder LKB Bromma mod. 2197
- Centrífuga Beckman Mod. J2-21
- Tubos para centrifuga, de 50 ml de capacidad
- Viales de 2.5 ml
- Micropipeta Socorex 10 a 100 μ l

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

Solución buffer de corrido (5X)

Tris base	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
H ₂ O cbp	1000 ml

En el momento de uso se diluyó en una razón 1:5 en agua destilada, (60 ml de amortiguador 5X + 240 ml de agua destilada), con lo cual se obtuvo la cantidad suficiente para una corrida en la cámara miniprotean II

Persulfato de amonio

Esta solución se preparó en el momento previo a la preparación del gel y se emplearon 40 mg de persulfato de amonio (PAS) en 0.2 ml de H₂O.

Acrilamida al 15% bis acrilamida al 0.8%

Acrilamida	15.0 g
Bis Acrilamida	0.4 g
H ₂ O cbp	100.0 ml

Se filtró y se guardó en frasco ámbar forrado de papel aluminio y en refrigeración.

Tris HCl 1.5 M Ph 8.8

Tris base	18.15 g
H ₂ O cbp aforar a	100.00 ml

El pH se ajustó con HCl 1 N. Se mantuvo en refrigeración y se preparó frecuentemente, ya que no se puede conservar por mucho tiempo.

SDS 10 %

SDS	10	g
H ₂ O cbp	100	ml

Solución fijadora

2-propanol (isopropanol)	250	ml
Acido acetico Glacial	100	ml
H ₂ O cbp	1000	ml

Solución de Teñido

Azul de Coomassie	0.3	g
Metanol	50.0	ml

Se agitó con un magneto durante 14 horas en un matraz erlenmeyer tapado, se le agregaron 10 ml de acido acético glacial y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución de desteñido

Metanol	120	ml
Acido acético Glacial	20	ml
Agua destilada	280	ml

Solución de resuspendido

Tris	0.6057	g
EDTA-Na ₂	0.0772	g

Se disolvió en 90 ml de agua destilada, ajustó el pH a 7.2 con HCl concentrado y se diluyó a 100 ml con agua destilada.

Solución 100 % de ácido tricloroacético (TCA) 1:1 (p/v)

Acido tricloroacético	1000	g
Agua destilada cbp	1000	ml

Sol. TCA 24 %

Sol. TCA 100 %	24	ml
Agua destilada cbp	100	ml

Sol. TCA 50%

Sol. TCA 100 %	50	ml
Agua destilada cbp	100	ml

Sacarosa 50 % / Azul de bromofenol 0.002%

Sucrosa	12.5	ml
Solución de azul de bromofenol	1.0	ml *
Agua destilada cbp	25.0	ml

*Se añadió antes de terminar de aforar con agua

Azul de Bromofenol 0.002%

Azul de bromofenol	0.05	g
Agua destilada cbp	100.00	ml

El indicador se mezcló con 1 ml de solución de NaOH y después se le agregó el agua para facilitar su disolución.

Acido acético 7 %

Acido acético	7	ml
Agua destilada cbp	100	ml

Eter etílico-Etanol 1:1 (v/v)

Eter etílico (etil éter)	500	ml
Etanol	500	ml