

# LA LACTULOSA, INDICADOR DE TRATAMIENTO TÉRMICO EN LECHE ENRIQUECIDAS COMERCIALES COLOMBIANAS

## LACTULOSE, INDICATOR OF HEAT TREATMENT IN COLOMBIAN COMMERCIAL FORTIFIED MILK

## LACTULOSE, INDICADOR DE TRATAMIENTO DE CALOR EM COMERCIAL LEITES ENRIQUECIDOS COLOMBIANO

MAITE DEL PILAR RADA-MENDOZA<sup>1</sup>, MARISOL SALAZAR S.<sup>2</sup>

### RESUMEN

*En este estudio se implementó la técnica de espectrofotometría UV-Visible, herramienta útil para determinar la concentración de Lactulosa (en 21 tipos de leches UHT comerciales colombianas con diferentes contenidos de grasa, deslactosadas y enriquecidas con vitaminas, minerales y fibra) y, poder evaluar la intensidad del tratamiento térmico al cual fueron sometidas. Como criterio de confianza del método se determinó la exactitud (recuperación alrededor del 92%), la precisión instrumental (inferior a 9,0%), linealidad en el rango de trabajo (0,9996), LD (0,026 mg/mL) y LC (0,083 mg/mL); adicionalmente, hubo selectividad y reproducibilidad. Los niveles de Lactulosa estuvieron entre 0,7 y 6,8 mg/mL y estos resultados no mostraron influencia por la composición en grasa. Las leches deslactosadas mostraron los más bajos niveles de Lactulosa y las enriquecidas con minerales las mayores. En general, la variación encontrada puede deberse a: diferencias en el tratamiento tér-*

---

**Recibido para evaluación:** 10/12/2010. **Aprobado para publicación:** 18/8/2011

1      Química, Magíster en Química, Dr. en Ciencias Químicas. Universidad del Cauca, Docente Titular  
Departamento de Química. Grupo BICAMSA.

2      Química. Universidad del Cauca, Departamento de Química.

**Correspondencia:** e-mail: [mrada@unicauca.edu.co](mailto:mrada@unicauca.edu.co).

*mico al que se sometieron, contenido inicial de lactosa, pH, concentración de fosfatos y posterior período y condiciones de almacenamiento. Estas leches también fueron caracterizadas fisicoquímica y microbiológicamente. Los valores obtenidos estuvieron de acuerdo con lo reportado por el Ministerio de Salud y por tanto, son aptas para el consumo humano.*

## ABSTRACT

*In this study we implemented the technique of UV-Visible spectrophotometry, a useful tool for determining the concentration of Lactulose in 21 types of Colombian commercial UHT milk with different fat contents, Lactose-free and enriched with vitamins, minerals and fiber, and evaluate the intensity of heat treatment to which they were subjected. As a criterion of confidence of the method was determined accuracy (about 92% recovery), precision instruments (less than 9,0%), linearity in the range (0,9996), LD (0,026 mg/mL) and LC (0,083 mg/mL) was further selectivity and reproducibility. Lactulose levels were between 0,7 and 6,8 mg/mL and these results did not influence the composition of fat. Lactose-free milks showed the lowest levels of lactulose and mineral enriched the majors. In general, the variation found may be due to differences in heat treatment which was applied, initial lactose content, pH, phosphate concentration and subsequent period and storage conditions. These milks were also characterized physicochemically and microbiologically. The values obtained were in agreement with those reported by the Ministry of Health and are therefore unfit for human consumption.*

## RESUMO

*Neste estudo, aplicou a técnica de espectrofotometria de UV-Visível, uma ferramenta útil para determinar a concentração de lactulose em 21 tipos de leite UHT colombiano comerciais com diferentes teores de gordura, sem lactose e enriquecido com vitaminas, minerais e fibras e, avaliar a intensidade tratamento térmico a que eram submetidos. Como critério de confiança do método foi determinada precisão (cerca de 92% de recuperação), instrumentos de precisão (menos de 9,0%), linearidade no intervalo (0,9996), LD (0,026 mg/mL) e LC (0,083 mg/mL); foi maior seletividade e reprodutibilidade. Lactulose níveis foram entre 0,7 e 6,8 mg/mL e estes resultados não influenciaram a composição de gordura. Leite sem lactose apresentaram os menores teores de lactulose e mineral enriquecida maiores. Em geral, a variação encontrada pode ser devido a diferenças de tratamento térmico, que foi aplicada, o conteúdo inicial de lactose, pH, concentração de fosfato e do período subsequente e as condições de armazenamento. Essas fórmulas foram também caracterizadas physicochemically e microbiologicamente. Os valores obtidos foram de acordo com aqueles relatados pelo Ministério da Saúde e são, portanto, impróprias para consumo humano.*

## PALABRAS CLAVE:

*Lactulosa, leches enriquecidas comerciales, UV-Visible, lactosa, estandarización.*

## KEYWORDS:

*Lactulose, enriched commercial milks, UV-Vis, lactose, standardization*

## TERMOS DE INDEXAÇÃO:

*Lactulose, comercial leites enriquecidos, UV-visível, lactose, normalização*

## INTRODUCCIÓN

La leche, desde el punto de vista nutricional, es considerada un alimento casi completo para el hombre [1]. Por su equilibrada composición, es un alimento noble que provee a nuestro organismo de proteínas, grasa, carbohidratos (Lactosa en mayor proporción, Glucosa y Galactosa en cantidades traza) y algunas vitaminas y minerales necesarios para el organismo [2].

La salubridad y aceptabilidad de este alimento dependen de un control sanitario muy estricto [1], cuyo objeto es reducir al mínimo los posibles peligros para la salud (de quien la consume), debidos a la presencia de microorganismos; para ello, la leche cruda es sometida a procesos físicos de higienización: Pasteurización, ultrapasteurización, irradiación y esterilización; estos procedimientos están basados en una relación de temperatura-tiempo que no permite alterar, en la leche, ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas u organolépticas [3], pero que no siempre son suficientes para garantizar un tiempo prolongado de vida útil del producto [4].

Por otra parte, los tratamientos térmicos pueden producir en la leche de partida modificaciones indeseables, presentándose cambios en algunos de los componentes de la leche, como es el caso de los carbohidratos y minerales, que pueden alterar el aroma, el color, la consistencia y reducir el valor nutritivo debido a la formación de compuestos que no estaban presentes en la leche no procesada, tales como son la lactulosa, el hidroximetilfurfural, la furosina, etc [5].

Para producir leches de elevada calidad, es necesario conocer los cambios que ocurren en los componentes de la misma durante el tratamiento térmico al que son sometidas [6], puesto que su calidad puede estar relacionada con la cantidad de calor aplicado durante los procesos; por tanto, es necesario contar con indicadores que permitan identificar el tipo de tratamiento empleado y como una medida de control del proceso [7]. Uno de los indicadores de tratamiento térmico más extensamente estudiado es la lactulosa (4-O-b-D-galactopiranosil-D-fructofuranosa), conocida por su formación durante el tratamiento térmico. Este indicador se forma por una reacción de isomerización de la lactosa mediante la transformación Lobry de Bruyn-Alberda Van Ekenstein y representa indudablemente el índice más apropiado para establecer la carga de calor a la cual la leche fue sometida [6].

Es importante considerar que la calidad de la leche comercial, también puede ser relacionada con la cantidad de calor aplicado durante su procesamiento [7] y es por ello, que se hace necesario considerar una serie de análisis físicos, químicos y microbiológicos que permitan calificarla como apta.

Los métodos empleados para la determinación de Lactulosa, han incluido desde técnicas espectrofotométricas hasta cromatográficas [8, 9].

Adicionalmente, una leche para ser aceptable, debe estar libre de gérmenes patógenos y debe además, mantener una buena presentación, alto valor nutritivo y estar limpia y libre de materias extrañas y sedimentos [10]. Los valores obtenidos deberán estar de acuerdo con las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos (Decreto 476 de 1998) [3]; cualquier discrepancia en los resultados, pondrá al descubierto posibles alteraciones, adulteraciones o fraudes [11].

En el presente trabajo se planteó como objetivo, evaluar el contenido de lactulosa como un indicador de calidad de leches enriquecidas comerciales de consumo procesadas térmicamente, mediante la estandarización de la técnica de espectrofotometría UV-visible, la cual podrá ser empleada de forma rutinaria por las industrias lácteas.

## MÉTODO

### Toma y preparación de las muestras

El muestreo se realizó bajo las condiciones y requisitos establecidos en las Normas y procedimientos reglamentarios de la Industria de Alimentos, INVIMA [3]. Se seleccionaron 21 variedades de leches UHT directamente de los supermercados de la ciudad de Popayán, en envase Tetra Pak, con diferente contenido de grasa (Enteras, semidescremadas y descremadas), con adición de vitaminas, minerales y fibra y, deslactosadas, y que tuvieran una fecha de vencimiento hasta de seis meses.

Una vez adquiridas, se trasladaron al laboratorio de la Unidad de Análisis Industriales (UAI), donde se envasaron en frascos de vidrio y refrigeraron a 4°C, para llevar a cabo las pruebas de caracterización. Adicionalmente, se

congeló una cantidad de cada leche, la cual se destinó para la cuantificación de lactulosa.

### Optimización de las pruebas microbiológicas

Se realizó un análisis microbiológico por triplicado inmediatamente a la llegada de las muestras al laboratorio.

### Prueba de reducción del azul de metileno (TRAM)

En un tubo de ensayo de 20 mL de capacidad, se adicionaron 10 mL de leche; se agregó 1 mL de la solución de azul de metileno y se agitó constantemente hasta homogeneización. El tubo se tapó con un algodón y se mantuvo en un baño maría a 37-38°C. Se monitoreó el tiempo necesario para la decoloración, la cual ocurre cuando todo el contenido del tubo se ha decolorado completamente ó al menos 5 mm desde la superficie. Como criterio de comparación, se adicionó a un tubo similar, 10 mL de la muestra de leche y 1 mL de agua corriente.

### Prueba de Fosfatasa

En un tubo de ensayo de 10 mL de capacidad, se adicionaron 5 mL de una solución de p-nitrofenilortofosfato disódico al 0,15%, se tapó y se colocó en un baño maría a 37°C durante 5 minutos; después de este tiempo, se le adicionó 1 mL de la muestra de leche y se incubó en un baño maría durante dos horas a 37°C. El desarrollo de un color amarillo indica que hay presencia de la enzima. Como criterio de comparación, a un tubo similar se le adicionó 1 mL de leche cruda para tomarlo como referencia.

### Optimización de las pruebas físico-químicas

Se realizaron los análisis físico-químicos establecidos y por triplicado, como requisito para el control de calidad de la leche por las Normas y procedimientos reglamentarios de la Industria de Alimentos, INVIMA [3], que incluyeron acidez, densidad, pH, grasa, proteína, cenizas y extracto seco total y desengrasado, según los métodos oficiales de análisis de la AOAC INTERNATIONAL [12].

**Determinación de acidez.** Se empleó como indicador fenolftaleína al 1%. El contenido se tituló con una solución estándar de NaOH 0,1N. La acidez fue expresada como porcentaje (p/v) de ácido láctico.

**Determinación de la densidad.** Se realizó a una temperatura de 15°C ( $\pm 1,0^\circ\text{C}$ ), empleando un lactodensímetro.

**Determinación de pH.** Se realizó a temperatura ambiente, con la ayuda de un pH-metro METTLER TOLEDO 8603, previamente calibrado.

**Determinación de grasa.** Se empleó un butirómetro de escala 0-8%, que permitió una separación de la grasa de forma nítida y su lectura de forma directa.

**Determinación de proteína.** Se empleó como catalizador  $\text{K}_2\text{SO}_4\text{-CuSO}_4\text{-TiO}_2$ . La muestra fue digerida a 370°C; posteriormente fue destilada en el equipo BÜCHI adicionando 50 mL de álcali al 30% en exceso para liberar el amoníaco, el cual se destiló por arrastre de vapor y se recogió en  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4% con una solución indicadora de tashiro; se tituló el borato de amonio con HCl 0,1N. Paralelamente se analizó un blanco en las mismas condiciones del procedimiento anterior. El contenido de nitrógeno y proteína se expresó en porcentaje, utilizando un factor de conversión a gramos de nitrógeno de 6,38.

**Determinación de cenizas.** Una vez seca la muestra, se colocó en un horno de calcinación TERRIGENO D-8 a 425°C, y se aumentó gradualmente la temperatura a 550°C durante 2 horas hasta obtener ceniza blanca ó grisácea. El contenido de cenizas se expresó en porcentaje.

**Determinación de extracto seco (ES).** Se realizó usando la fórmula de Richmond [13] (ecuación 1).

$$\%ES = 250(\rho - 1) + 0,2(\%G) + 0,14 + \%G \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde,

ES = Extracto seco

$\rho$  = Densidad de la leche a 15°C

%G = Porcentaje de materia grasa

**Determinación del extracto seco desengrasado (ESD).** Se realizó usando la fórmula de Richmond [13] (ecuación 2).

$$\%ESD = 250(\rho - 1) + 0,2(\%G) + 0,14 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde,

ESD = Extracto seco desengrasado

$\rho$  = Densidad de la leche a 15°C

%G = Porcentaje de materia grasa

## Optimización de las condiciones experimentales del método espectrofotométrico para la determinación de lactulosa

La cuantificación de lactulosa en las muestras de leche, se llevó a cabo utilizando la técnica de Espectrofotometría UV-Visible, con un equipo THERMO GENESYS 6, empleando la región visible, debido a la formación de un compuesto coloreado.

### Selección de la longitud de onda

Con el fin de conocer la longitud de onda de máxima absorción y poder preparar una curva de calibración que relacionara la absorbancia del analito con su concentración, se realizó un barrido en la región visible, comprendida en el intervalo de 380 a 800 nm [14, 15], con soluciones patrón de lactulosa de 3 y 15 mg/mL, preparadas a partir de Lactulosa (95% de pureza, Sigma).

### Método de cuantificación

El método empleado para el análisis cuantitativo fue la curva de calibración y para ello se prepararon soluciones patrón con concentraciones de 0,07, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 y 1,0 mg/mL. Con las absorbancias registradas para cada concentración, se construyó la curva patrón; luego, se registraron las absorbancias de las muestras y con el valor promedio, se determinaron las concentraciones correspondientes.

### Puesta a punto del método analítico para la determinación de lactulosa

Una vez seleccionada la longitud de onda, se procedió a optimizar los parámetros estadísticos que establecerán la confiabilidad de los resultados.

### Linealidad

Para evaluar la linealidad, se preparó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 0,07, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 y 1,0 mg/mL de lactulosa. Las soluciones se prepararon previamente al análisis y se mantuvieron almacenadas a 4°C; a cada solución patrón de lactulosa se le realizaron cinco lecturas y a partir de los datos obtenidos de absorbancia y sus respectivas concentraciones, se trazaron las curvas de calibración y se obtuvieron las ecuaciones de las rectas.

### Precisión

La precisión se estableció en condiciones de repetibilidad y su evaluación correspondió tanto al sistema como al método, es decir, desde la toma y preparación de la muestra hasta la medición espectrofotométrica de la lactulosa. *Repetibilidad espectrofotométrica.* Para evaluar la repetibilidad ó precisión espectrofotométrica, se realizaron cinco lecturas repetidas (N=5) de la absorbancia de los patrones (0,1 y 0,3 mg/mL) y de la muestra de leche ApSCaV. Esta determinación se realizó en diferentes días (10 días consecutivos), para la misma muestra.

*Repetibilidad del método.* Fue determinada realizando diez lecturas de una muestra de leche ApSCaV y de dos soluciones patrón de lactulosa (0,1 y 0,3 mg/mL), en diez diferentes días.

### Sensibilidad

Los parámetros empleados para determinar la sensibilidad fueron los límites de detección y cuantificación, para los cuales se prepararon dos soluciones estándar de las concentraciones más bajas (0,1 y 0,3 mg/mL), las cuales se midieron diez veces al igual que un blanco y se analizó la relación señal/ruido.

### Exactitud

Para conocer la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia (curva de calibración), se evaluó la exactitud en términos del porcentaje de recuperación de la lactulosa.

Para ello, se empleó una muestra de leche PS y una solución patrón de baja concentración 0,1 mg/mL, a las cuales se les agregó cierta cantidad conocida de una solución patrón de lactulosa de 1,0 mg/mL. A cada uno se le midió cinco veces el valor de su absorbancia y se le halló el porcentaje de recuperación.

### Estabilidad de la lactulosa

Para evaluar la estabilidad de patrones y muestras en el tiempo, se prepararon tres soluciones estándar de diferente concentración (0,07, 0,1 y 0,3 mg/mL) y una muestra de leche (ApSCaV), las cuales fueron analizadas y almacenadas a 4°C para leerlas nuevamente durante diez días consecutivos.

### Extracción de lactulosa y obtención del complejo absorbente

Para obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, resultados confiables para la determinación de lactulosa, se optimizaron las condiciones experimentales del método analítico.

#### Extracción de lactulosa

Para extraer la lactulosa de las muestras de leche, se tomó 1 mL de la muestra y se aforó a 10 mL con metanol [16], como se muestra en la figura 1.

A continuación, la disolución se transvasó rápidamente a un tubo de ensayo, se agitó en un vortex durante 1 minuto y se dejó en reposo en la nevera hasta el día siguiente para evitar la volatilización del metanol y precipitar la proteína.

**Formación del complejo coloreado.** Para formar la especie que absorbió en la región visible, se empleó un método cetoespecífico modificado, propuesto previamente para la determinación de lactulosa en mezclas de lactosa-lactulosa [17]. Este método se basa en el uso del reactivo antrona-ácido acético-ácido fosfórico-etanol. Para ello, en un tubo de ensayo que previamente se colocó dentro de un baño de agua fría, se adicionó una alícuota de 0,2 mL del sobrenadante obtenido en la precipitación de proteínas con metanol, en el cual se encuentra soluble la lactulosa; se adicionaron 4 mL de etanol absoluto y 0,5 mL del reactivo de antrona. Se colocó a ebullición a 94°C durante 30 minutos y una vez atemperado por 10 minutos, se le adicionó 6 mL de ácido acético glacial. Finalmente, se midió

Figura 1. Extracción de lactulosa en metanol.



la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro UV-Vis THERMO GENESYS 6. Cada determinación se llevó a cabo por triplicado y utilizando un blanco de reactivos.

## RESULTADOS

### Pruebas microbiológicas

Los resultados indican que todas las muestras de leche analizadas están exentas de microorganismos, ya que durante más de las 7 horas dispuestas para el análisis de TRAM, no hubo cambio de color del indicador azul de metileno, debido a la ausencia de bacterias reductoras responsables de la reducción de este indicador; así mismo, la prueba de fosfatasa resultó negativa como se esperaba, puesto que esta enzima solamente está activa en la leche cruda, es decir, cuando aún no ha pasado por ningún tipo de tratamiento de pasteurización, lo cual indica que las leches analizadas, fueron sometidas a un eficaz tratamiento de higienización, que garantizó la destrucción de los gérmenes patógenos.

Las leches son aptas para consumo humano ó como materia prima para la elaboración de derivados lácteos y cumplen con la normativa del Ministerio de Salud [3].

### Pruebas Físicoquímicas

Dado que existe una relación directa entre las concentraciones de algunos de los constituyentes de la leche y el contenido de grasa [4], las leches analizadas se clasificaron de acuerdo a este contenido como enteras, semi-descremadas y descremadas. Las leches deslactosadas provienen de leches semi y descremadas y contienen como su nombre lo indica, menor contenido del azúcar lactosa. En la tabla 1 se detallan los resultados de densidad, acidez y pH.

Todas las leches analizadas presentaron valores de densidad, acidez y pH acordes a la norma [3]. El pH y la acidez, constituyen la acidez natural debida a la presencia de fosfatos ácidos, caseína, CO<sub>2</sub> y citratos ácidos disueltos en ella [10], mas no a una acidez debida a la acción de *Streptococcus lácticos*. Como se esperaba, a medida que el contenido graso disminuyó, la densidad aumentó, comportamiento observado también para las leches deslactosadas.

**Tabla 1.** Densidad (g/mL), acidez (%) y pH en leches enriquecidas UHT comerciales. Datos promedio ( $\pm$  desviación estándar) de determinaciones por triplicado.

Muestra	Densidad (g/mL)	Acidez (%)	pH
<b>Leches enteras</b>			
ALE	1,030a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
CEV	1,033a $\pm$ 0,000	0,14a $\pm$ 0,00	6,7a $\pm$ 0,0
PEFeV	1,032a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
<b>Leches semi-descremadas</b>			
PSOV	1,032a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
PS	1,032a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
CSV	1,033a $\pm$ 0,000	0,14a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
APSV	1,034a $\pm$ 0,001	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
APSMV	1,034a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
APSCaV	1,033a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,1
SFS	1,032a $\pm$ 0,001	0,14a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
<b>Leches descremadas</b>			
CDV	1,034a $\pm$ 0,000	0,14a $\pm$ 0,00	6,7a $\pm$ 0,1
ALDF	1,034a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
APD	1,035b $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
APDF	1,036b $\pm$ 0,000	0,14a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
<b>Leches deslactosadas</b>			
SFSD	1,032a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
PSD	1,034a $\pm$ 0,000	0,14a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
ALSDF	1,034a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
APSD	1,034a $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
CSDV	1,034a $\pm$ 0,000	0,14a $\pm$ 0,00	6,6a $\pm$ 0,0
PDD	1,034a $\pm$ 0,001	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0
APDD	1,035b $\pm$ 0,000	0,15a $\pm$ 0,00	6,5a $\pm$ 0,0

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ )

En la tabla 2 se resumen los valores obtenidos para ceniza, proteína y grasa.

Los minerales representan alrededor del 0,6-0,8% del peso de la leche [18], rango dentro del cual se encuentran las muestras de leche analizadas; en la tabla 3 se indican los valores reportados por las empresas con respecto a este contenido. Las leches enriquecidas con Fe, Ca y Zn (APSMV y APSCaV), presentaron los más altos valores, debido a que se encuentran en forma de cloruros, fosfatos y citratos tanto en estado coloidal como en solución [11].

La proteína (2,4-2,7%) estuvo muy por debajo de los valores referenciados por otros autores [19]; lo anterior puede ser debido a que los procesos de industrialización para el enriquecimiento de las leches con minerales como Na, Ca, Fe, P y Zn, tienen efectos negativos sobre el valor nutritivo de las proteínas, ya que se pueden dar reacciones desfavorables, habitual-

**Tabla 2.** Ceniza, proteína, y grasa (%) en leches enriquecidas UHT comerciales. Datos promedio ( $\pm$  desviación estándar) de determinaciones por triplicado.

Muestra	Ceniza (%)	Proteína (%)	Grasa (%)
<b>Leches enteras</b>			
ALE	0,73 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	3,5 <sup>c</sup> $\pm$ 0,1
CEV	0,75 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	3,1 <sup>c</sup> $\pm$ 0,1
PEFeV	0,71 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	3,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,1
<b>Leches semi-descremadas</b>			
PSOV	0,75 <sup>c</sup> $\pm$ 0,02	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
PS	0,76 <sup>c</sup> $\pm$ 0,04	2,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,6 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
CSV	0,75 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,6 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
APSV	0,76 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
APSMV	0,79 <sup>b</sup> $\pm$ 0,00	2,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
APSCaV	0,81 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
SFS	0,72 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00	2,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,6 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
<b>Leches descremadas</b>			
CDV	0,71 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
ALDF	0,78 <sup>c</sup> $\pm$ 0,02	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	0,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APD	0,77 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	0,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APDF	0,75 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
<b>Leches deslactosadas</b>			
SFSD	0,64 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	2,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	2,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
PSD	0,73 <sup>c</sup> $\pm$ 0,02	2,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,6 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
ALSDF	0,72 <sup>c</sup> $\pm$ 0,02	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
APSD	0,74 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
CSDV	0,72 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1
PDD	0,76 <sup>c</sup> $\pm$ 0,02	2,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	0,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APDD	0,74 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00	2,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ )

mente en la estructura primaria, con una disminución del contenido en aminoácidos esenciales o formación de derivados antinutritivos [4] y esto puede deberse a que al ser las proteínas sensibles a la acción del calor, se desnaturalizan a temperaturas de ultra-pasteurización. En la tabla 4 se indican los valores reportados por las empresas, en cuanto al contenido de vitaminas y aminoácidos.

Los contenidos de grasa presentaron valores dentro de lo reglamentado [3], aunque los valores de 0,0% encontrados para las leches CDV y ApDD, no indican la totalidad del desnatado, sino que su contenido en grasa es mucho menor al que se puede detectar con el butirómetro que se empleó.

En la tabla 5 se reportan los valores de ES y ESD.

Al aplicar la fórmula de Richmond, se encontró que las leches contienen los valores mínimos exigidos para

**Tabla 3.** Componentes minoritarios de las leches UHT, según la información nutricional del envase tetrapak.

Muestra	Información Nutricional (Tamaño porción 200 mL)					
	MINERALES					
	Na (mg)	Ca (%)	Fe (%)	P (%)	Zn (%)	Total (g)
Leches Enteras						
ALE	96	48,0	1,0			
CEV	100	25,0	1,0			
PEFeV***		0,12	0,48			
Leches semi-descremadas						
PSOV**		0,12				
PS		0,12				1,22
CSV	100	25,0	1,0			
APSV	76	28,0		16,0		
APSMV	95	35,0	20,0	25,0	35	
APSCaV	76	62,4		35,0		
SFS		0,11		88,0		1,40
Leches descremadas						
CDV	80	25,0	1,0			
ALDF	96	48,0	1,0			
APD	104	24,0		20,0		
APDF		48,0		16,8		
Leches deslactosadas						
SFSD*		0,12				1,40
PSD*		0,12				1,20
ALSDF*	97	48,0	1,0			
APSD*	76	28,0		16,0		
CSDV*	100	22,0	1,0			
PDD*		0,12				1,20
APDD*	76	24,0		20,0		

\* Enzima lactasa, \*\* Estabilizante tripolifosfato de sodio, \*\*\* Hierro minoquelado

ambos parámetros [3], sin embargo, las leches enteras presentaron un alto valor de ES y por ende de ESD.

Estas fluctuaciones son posibles debido al alto contenido de otros componentes diferentes a la grasa, como pueden ser las proteínas, azúcares, sales minerales y vitaminas; adicionalmente, estas leches presentan porcentajes considerables de Na, Ca y de vitaminas A, D y B, que estarían aportando al valor de ES. Como se esperaba, una disminución en el contenido de materia grasa, redujo los valores de ES y ESD.

Finalmente, este diagnóstico preliminar, permitió verificar la calidad de las leches analizadas y por consiguiente el cumplimiento de las normas legislativas respecto a la composición mínima que debe presentar una leche UHT apta para el consumo.

**Tabla 4.** Componentes mayoritarios de las leches UHT, según la información nutricional del envase tetrapak.

Muestra	Información Nutricional (Tamaño porción 200 mL)					
	VITAMINAS					
	A (%)	D (%)	C (%)	B <sub>1</sub> (%)	B <sub>2</sub> (%)	Biotina (%)
Leches Enteras						
ALE	4,0	40,0	0,0			
CEV	20,0	25,0		22,0	16,0	
PEFeV	0,078	0,001		0,06	0,08	9,0
Leches semi-descremadas						
PSOV			20,0			
PS	0,075	0,001				
CSV	10,0	20,0				
APSV	12,0	12,0				
APSMV	17,5	50,0	12,5	15,0	25,0	50,0
APSCaV	12,0	12,0				
SFS					0,16	
Leches descremadas						
CDV	20,0	24,0		22,0	16,0	
ALDF	0,0	0,0	0,0			
APD	12,0	12,0				
APDF*	24,0	42,4				
Leches deslactosadas						
SFSD						
PSD						
ALSDF	2,0	20,0	0,0			
APSD						
CSDV	25,0	25,0		26,0	16,0	
PDD						
APDD	12,0	12,0				

\*Fibra dietaria (2,48g/200mL)

Optimización de las condiciones experimentales del método espectrofotométrico para la determinación de lactulosa

### **Estandarización del método espectrofotométrico UV-Vis**

La optimización del método espectrofotométrico permite la determinación sencilla y confiable de lactulosa, mediante la adecuada elección de la longitud de onda y del método de cuantificación.

El máximo de absorción para la determinación de lactulosa fue de 425 nm (equipo THERMO GENESYS 6). La ecuación de la curva de calibración fue  $Y = 0,0483X - 0,0023$  ( $r$  de 0,9996), demostrando así la linealidad del método.



**Tabla 5.** Extracto seco (%) y extracto seco desengrasado (%) en leches enriquecidas UHT comerciales. Datos promedio ( $\pm$  desviación estándar) de determinaciones por triplicado.

Muestra	ES (%)	ESD (%)
Leches enteras		
ALE	11,8 <sup>c</sup> $\pm$ 0,1	8,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
CEV	12,1 <sup>c</sup> $\pm$ 0,1	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
PEFeV	11,7 <sup>c</sup> $\pm$ 0,5	8,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
Leches semi-descremadas		
PSOV	10,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0	8,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
PS	10,1 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0	8,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
CSV	10,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	8,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APSV	10,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	8,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1
APSMV	10,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APSCaV	10,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	8,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
SFS	10,2 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	8,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1
Leches descremadas		
CDV	8,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	8,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
ALDF	8,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	8,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APD	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	8,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APDF	9,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	9,2 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
Leches deslactosadas		
SFSD	10,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	8,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
PSD	10,6 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
ALSDF	10,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
APSD	10,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
CSDV	10,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
PDD	8,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	8,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1
APDD	8,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	8,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0

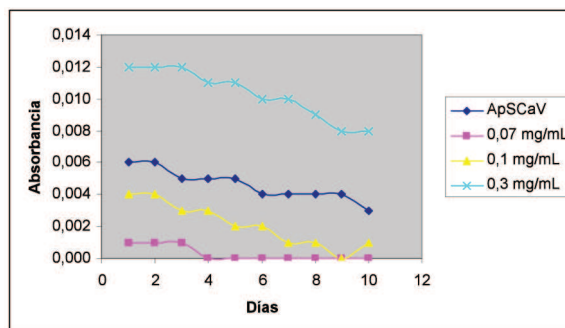
Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ )

La repetitividad del método y del sistema completo mostró valores inferiores a 8,3 y 9,0% para patrones de Lactulosa y de 0,0% para la muestra APSCaV, por lo que se puede concluir que la precisión del método es adecuada para la obtención de datos repetitivos y confiables para su determinación en leches. El límite de detección fue de 0,026 mg/mL y el límite de cuantificación fue 0,083 mg/mL, calculados como la cantidad necesaria para obtener una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. En el cálculo de la exactitud, los porcentajes de recuperación estuvieron alrededor del 92%, lo cual indica la exactitud del método analítico empleado.

**Estabilidad.** Se determinó el tiempo y condiciones bajo las cuales una muestra preparada puede ser medida reproduciblemente.

La tendencia que se observa en la figura 2 es la pérdida de lactulosa durante los diez días consecutivos, la cual

**Figura 2.** Estabilidad de la lactulosa durante diez días consecutivos.



permite concluir que la obtención de datos confiables para la estimación de lactulosa en leches líquidas, puede hacerse durante los dos primeros días de preparada la muestra, mientras haya sido almacenada en un vial de vidrio con tapa rosca, sellada herméticamente y a una temperatura de 4°C. La manipulación de la muestra debe hacerse lo más rápido posible, para evitar la volatilización del metanol y por consiguiente el aumento en la concentración de lactulosa, generando así datos erróneos.

**Cuantificación de Lactulosa.** La tabla 6 muestra los valores correspondientes a la determinación de Lactosa y Lactulosa. La variación encontrada, puede deberse a las diferentes condiciones de higienización (UHT, 132°C, 5 s), a las cuales se someten las leches en las diferentes industrias lácteas colombianas, y a su posterior período y condiciones de almacenamiento.

De acuerdo a los resultados mostrados, en general, el contenido de Lactulosa no está influenciado por la composición en cuanto a materia grasa; esta conclusión es similar a la propuesta por Berg en 1993 [6], quien concluyó que los valores de grasa entre 0,0 y 4,5%, no tienen un efecto significativo sobre las reacciones de degradación de la lactosa; sin embargo, el contenido de lactosa sí. Las leches deslactosadas mostraron los más bajos niveles de Lactulosa, posiblemente debido a su contenido de lactosa hidrolizada y en mínima cantidad, que limita las reacciones de degradación de la lactosa [20]. Las leches APDF y APSMV, presentaron los contenidos más altos de Lactulosa, debido a su mayor contenido de lactosa. Las leches APSCaV y ALDF, también presentaron un alto contenido, ya que la fortificación de los alimentos con Calcio se realiza con fosfatos de Calcio di y tribásico y carbonatos que requieren un aumento de 10°C más en la temperatura

**Tabla 6.** Lactosa (mg/10mL) y Lactulosa (mg/10mL) en leches enriquecidas UHT comerciales. Datos promedio ( $\pm$  desviación estándar) de determinaciones por triplicado.

Muestra	Lactosa (mg/10mL)	Lactulosa (mg/10mL)
Leches enteras		
ALE	500	17 <sup>e</sup> $\pm$ 0,0
CEV	500	13 <sup>d</sup> $\pm$ 0,0
PEFeV	480	17 <sup>e</sup> $\pm$ 0,0
Leches semi-descremadas		
PSOV	480	11 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
PS	490	7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
CSV	500	16 <sup>e</sup> $\pm$ 0,1
APSV	480	15 <sup>e</sup> $\pm$ 0,0
APSMV	550	32 <sup>g</sup> $\pm$ 0,0
APSCaV	480	19 <sup>f</sup> $\pm$ 0,0
SFS	470	11 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
Leches descremadas		
CDV	500	11 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
ALDF	500	19 <sup>f</sup> $\pm$ 0,1
APD	468	9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
APDF	520	68 <sup>h</sup> $\pm$ 0,4
Leches deslactosadas		
SFSD	70	11 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
PSD	24	9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
ALSDF	70	9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
APSD	70	9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
CSDV	0	7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
PDD	24	9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
APDD	70	9 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ )

de ultrapasteurización. La adición de vitaminas presentó influencia en el contenido de Lactulosa, debido a que éstas constan de estructuras químicas terpénicas y anillos heterocíclicos, piridoxínicos y piridínicos, que aunque no están involucradas en las reacciones de degradación de la lactosa, intervienen en el proceso.

La muestra APDF, que presentó mayor contenido de lactulosa, es una leche adicionada con fibra soluble (pectina no viscosa ó carboximetilcelulosa, CMC). Normalmente, las fibras adicionadas a la leche generan viscosidad en ella y están constituidas principalmente por monosacáridos como la glucosa, que podrían estar interactuando con las proteínas y de esta manera favorecer la formación de lactulosa libre; adicionalmente, esta leche presenta, según la información nutricional de su etiqueta, una de las mayores cantidades de lactosa con respecto a las demás leches.

A nivel general, los niveles de lactulosa encontrados en las muestras de leche analizadas, permitieron deducir que los tratamientos térmicos utilizados en nuestro país son más enérgicos de lo que teóricamente se esperaría en comparación con los niveles establecidos por la comunidad Europea [21, 22], cuyos valores promedio oscilan entre 3,1 a 5,7 mg/10mL. Esto es posible no solo por la alta tecnología desarrollada en dichos países para todo el proceso de tratamiento de leche, incluyendo cuidado de ganado, ordeño, manipulación, transporte, entre otros, sino también porque precisamente estos procedimientos en Colombia podrían estar careciendo de un adecuado control de calidad.

## CONCLUSIONES

La estandarización del método analítico por UV-Vis para determinar el contenido de lactulosa, representa para el sector de la industria y la educación, una herramienta de fácil acceso, sencilla y rápida para realizar estas determinaciones, con un grado óptimo de calidad.

Fue posible evaluar el contenido de lactulosa en las leches, dado que la Normatividad Colombiana nunca antes había utilizado este indicador como parámetro de calidad.

El contar con la técnica UV-Visible, permitirá a la industria láctea, acceder a controles mas rigurosos del tratamiento térmico aplicado a sus leches, en la obtención de productos de mayor calidad y que sean competitivos a nivel nacional e internacional.

Los niveles de lactulosa encontrados en las leches enriquecidas UHT, supera los niveles establecidos para este tipo de muestras, con respecto a otros estudios realizados con anterioridad en países europeos.

Los diferentes procesos térmicos aplicados en la industria son un factor determinante en la formación de lactulosa y por ello, se deben establecer las condiciones de tiempo y temperatura adecuados para cumplir con la normativa.

La caracterización microbiológica y fisicoquímica de las leches, permitió calificarla como una leche apta para el consumo humano, debido a los rangos establecidos por la legislación.

## AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de la UAI, ubicado en el Departamento de Química, Edificio de laboratorios de la Universidad del Cauca.

## REFERENCIAS

- [1] POTTER, N. y HOTCHKISS, J. *Ciencia de los alimentos*, Editorial Acibia, S.A., Zaragoza (España), 1991.
- [2] GALÁRRAGA, A. y ROCANDIO, P. *Leches bajas en Lactosa. Utilidad dietético-sanitaria e indicaciones, Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los alimentos*, 285, 51, 1997.
- [3] MINISTERIO DE SALUD. Instituto Colombiano de Normas Técnicas (Icontec). *Normas y Procedimientos Reglamentarios de la Industria de Alimentos. Capítulo IV. De la clasificación de las leches. Decreto No. 2437 del 30 de agosto de 1983. Capítulo I. Disposiciones generales y definiciones. Decreto No. 476 del 10 de marzo de 1998. República de Colombia, 1998.*
- [4] BADUI, S. *Química de los alimentos*, 1 ed., Editorial Alambra, México, 1989.
- [5] JIMÉNEZ, S. *Indicadores del deterioro de la leche. Conferencia pronunciada en: Anales de la real Academia de Ciencias Veterinarias de España, Madrid. [Citado el 13 de febrero de 2002].*
- [6] BERG, H. *Reactions of lactose during heat treatment of milk: A quantitative study [Ph.D. Thesis]. Wageningen, Agricultural University, 1993.*
- [7] VILLAMIEL, M., ARIAS, M., CORZO, N. and OLANO, A. *Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milks, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung Unders Forschung A*, 208, 169-171, 1999.
- [8] DE RAFAEL, D., CALVO, M.M. and OLANO, A. *Determination of low levels of lactulose in milk, Milchwissenschaft*, 51, 552-553, 1996.
- [9] ADHIKARI, A.K., SAHAI, D. and MATHUR, O. *A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in heated milk and milk products, Lait*, 71, 555-564, 1991.
- [10] ALMANZA, F. y BARRERA, E. *Tecnología de leches y derivados*, Unisur, Unidad Universitaria del Sur de Bogotá, Santa Fe de Bogotá, D.C., 1995.
- [11] VEISSEYRE, R. *Lactología técnica*, 2 ed. Acibia, España, 1980.
- [12] AOAC. *Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC Internacional (AOAC), 17th Ed., Published by AOAC INTERNATIONAL, William Horwitz, Maryland, 2003.*
- [13] LARRAÑAGA, I., CARBALLO, J., RODRÍGUEZ, M., FERNÁNDEZ, J.A. *Control e Higiene de los alimentos, grado superior*, Mc. Graw Hill, Madrid, 2004.
- [14] FURNISS, B., HANNAFORD, A., SMITH, P. y TATCHELL, A. *Vogel's. Text book of practical organic chemistry*, Longman Scientific & Technical, London, 1989.
- [15] SILVERSTEIN, R., BASSLER, G. y MORRILL, T. *Spectronic identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, Singapore, 1981.
- [16] CORZO, N., OLANO, A. and MARTÍNEZ, I. *Diferenciación de leches sometidas a distintos tratamientos térmicos mediante el análisis de la composición en disacáridos libres por cromatografía de gases, Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 26, 565-570, 1986.
- [17] NAGENDRA, R. and VENKAT, S. *An improved colorimetric method for the estimation of lactulose in lactose-lactulose mixtures, Food Chemistry*, 43, 399-402, 1992.
- [18] LOZANO, R. *Composición y propiedades de la leche*, 1 ed., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1998.
- [19] CHEFTEL, J. *Leche y productos lácteos*, 4 ed. Acibia, España, 2000.
- [20] GEOFFREY, A. *Formation and occurrence of lactulose in heated milk, Journal of Dairy Research*, 53, 665-680, 1986.
- [21] RADA-MENDOZA, M., VILLAMIEL, M. and OLANO, A. *Dissolved air effects on lactose isomerisation and furosine formation during heat treatment of milk, Le Lait. Dairy Science & Technology*, 82, 629-634, 2002.
- [22] CALVO, M., KLETT, S., SANTOS, M. y OLANO, A. *Estudio comparativo de la determinación de lactulosa en leches mediante CG y CLAR, Revista española de lechería*, 130, 261-264, 1989.