

# VALORACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE CRUDA EN LA ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE LECHE DE SOTARÁ – ASPROLESO, MEDIANTE LAS PRUEBAS INDIRECTAS DE RESAZURINA Y AZUL DE METILENO

## RAW MILK HYGIENIC QUALITY ASSESSMENT IN THE MILK PRODUCERS ASSOCIATION OF SOTARÁ – ASPROLESO, THROUGH INDIRECT TESTS OF REZASURIN AND METHYLENE BLUE

JHON JAIRO ZAMBRANO<sup>1</sup>, JOSÉ FERNANDO GRASS RAMÍREZ<sup>2</sup>

### PALABRAS CLAVE:

Leche cruda, calidad higiénica, resazurina, azul de metileno.

### KEY WORDS:

Raw milk, hygienic quality, resazurin, methylene blue.

### RESUMEN

*Esta investigación permitió encontrar la relación entre las dos pruebas colorimétricas empleadas como métodos indirectos en la determinación de la calidad higiénica de la leche cruda, como son la prueba de Resazurina en una hora y el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno. Para ello se analizaron 315 muestras por duplicado, conducentes a la realización de ambas pruebas de manera paralela, encontrándose diferencias significativas para los siguientes estadísticos: rangos con signo de Wilcoxon y t-student con  $P < 0,001$ . Las muestras obtenidas resultaron del seguimiento durante 6 meses del proceso de acopio de leche cruda en la Asociación de Productores de Leche de Sotará ASPROLESO, ubicada en Paispamba, cabecera municipal de Sotará – Departamento del Cauca. Paralelamente a este estudio, se determinó el efecto del transporte de la leche cruda en la calidad higiénica, mediante un comparativo entre la calidad de la leche entregada en las fincas al carro recolector y la calidad en el momento del recibo en el centro de acopio (planta de enfriamiento) en el municipio de Paispamba. Para esta valoración se analizaron 280 muestras procedentes de las 4 zonas de producción y recolección de leche cruda (Chapa, Piedra León, Ullucos y Paispamba). Los datos obtenidos fueron analizados por medias marginales para las cuatro rutas. La investigación permitió identificar que entre las dos pruebas (Resazurina y Azul de Metileno), resultó de mayor grado de exactitud para la determinación de la calidad higiénica, la prueba de Tiempo de Reducción de Azul de Metileno, en buena medida por demandar mayor exigencia en los reportes.*

---

Recibido para evaluación: Abril 7 de 2008. Aprobado para publicación: Julio 10 de 2008

1 Estudiante de pregrado de Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca

2 Docente Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca

Correspondencia: José Fernando Grass Ramírez : email: jfgrass@unicauca.edu.co

## ABSTRACT

*This investigation allowed to find the relation between the two colorimetric tests used as indirect methods in the determination of the hygienic quality of raw milk, as it is, One hour Resazurin test and Methylene blue reduction time. To do that 315 samples in duplicate were analyzed, leading to the perform of both tests in a parallel way, allowing to find significant differences for the next statistics: ranges with Wilcoxon signs and t-student with  $P < 0.001$ . The obtained samples resulted from the pursuit along 6 months of the raw milk storage process in the milk producers Association of Sotara (ASPROLESO), located in Paispamba, Sotara's town – Department of Cauca. Parallely to this research, raw milk transportation effect in the hygienic quality was determinate, through a comparative between the quality of the delivered milk to gathering vehicles in farms and the quality in the moment of the reception in the storage center (Cooling plant) in the municipality of Paispamba. For this assessment 280 samples coming from the 4 production and recolection zones of raw milk (Chapa, Piedra León, Ullocos and Paispamba) were analyzed. The Data obtained were analyzed by Marginal averages for the fourth routes. The researching allowed to identify that between both tests Resazurin and Methylene blue, Methylene blue reduction time resulted in a wider accuracy degree for the hygienic quality determination particularly because it demands a mayor requirement in the reports*

## INTRODUCCIÓN

La calidad de la leche cruda se establece con base a parámetros higiénicos, sanitarios y composicionales. La calidad higiénica resulta de especial importancia, por tratarse del contenido microbiano que está presente en la leche cruda, el cual se transfiere en buena medida a los productos que se elaboran a partir de ella en la industria láctea y que inciden de manera representativa en la vida útil tanto de la materia prima como del producto terminado.

La vigilancia y control del estándar microbiano es necesario en cada punto de la cadena láctea, en la obtención de la leche cruda en los hatos lecheros, en el trans-porte y manipulación, en el acopio y almacenamiento e incluso en las líneas de proceso [1].

Las herramientas para la determinación de este parámetro, actualmente, son muy sofisticadas y costosas, y sólo están al alcance de las grandes industrias procesadoras de alimentos, sin la posibilidad de que pequeños centros de acopio puedan acceder a esta tecnología. Pero Industrias y organizaciones con bajos recursos han retomado las técnicas convencionales de colorimetría para la determinación de la calidad higiénica de la leche cruda.

Las pruebas colorimétricas en cuestión, son técnicas de análisis versátiles y convencionales, que evidencian indirectamente la calidad higiénica de la leche cruda y su capacidad de conservación, por medio de cambios en la tonalidad de color. Su versatilidad radica en que

se requieren equipos de laboratorio y reactivos no muy cotosos, y se puede aplicar a gran número de muestras [1,6].

En Colombia el sistema de pago al productor por la calidad de la leche cruda suministrada a la industria, adoptó inicialmente la Reductasa o Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM) mediante la Resolución 0321 de 1999 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, sin embargo posteriormente fue derogada por la Resolución 0012 de 2007 del mismo Ministerio, donde se cambian los Métodos Indirectos de evaluación higiénica de la leche (TRAM) por el Método Directo de recuento total de bacterias mediante el Recuento en Placa (Ufc/mL).

Las Pruebas han estado sujetas a muchos estudios de comparación entre sí con otros análisis de referencia como el Recuento en Placa, el conteo de bacterias y leucocitos al microscopio; cada investigación se ha encaminado a presentar variantes de las pruebas con el fin de aproximarse a la calidad bacteriológica real de la leche cruda [2,3].

Entre las variantes encontradas en la literatura, estudios especializados establecen para la prueba de Azul de Metileno, que las muestras sometidas a evaluación se dejan almacenadas por 18 horas antes de incubarlas; para la Resazurina el uso de una escala de coloración con incubación a una hora, o prolongar el tiempo de incubación por tres horas teniendo como referencia una tonalidad particular de la Resazurina, o tener en cuenta el tiempo de reducción y la coloración

rosa como punto final para determinar el parámetro de calificación.

### ESTADO DEL ARTE

Las pruebas colorimétricas de Azul de Metileno y Resazurina, indican la variación del potencial de oxido-reducción en la leche por cambios en la tonalidad del colorante en solución, dependiendo de la actividad reductora de los microorganismos y de las sustancias reductoras presentes en la leche.

Como indicadores redox, la Resazurina y el Azul de Metileno tienen un rango de potencial cerca de 100mV en el cual suceden los cambios de color a formas decoloradas, estos cambios también se pueden determinar por potenciometría directa [4,5].

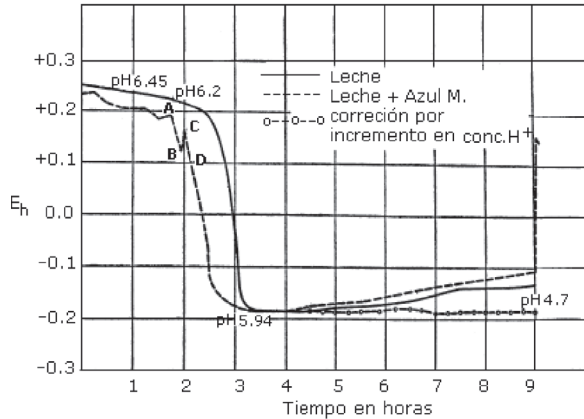
En la reducción de Azul de Metileno en solución, se conocen cuatro sistemas de reducción:

Un sistema bajo condiciones estrictamente anaeróbicas que es capaz de reducir el Azul de Metileno en la leche cruda.

- Un sistema también presente en la leche cruda el cual es capaz de reducir el Azul de Metileno anaeróticamente en presencia de formaldehído.
- Un sistema de reducción presente en leche pasteurizada el cual es revelado bajo condiciones anaerobias.
- Un sistema de reducción formado por leche cruda y leche pasteurizada anaeróticamente en presencia de luz.

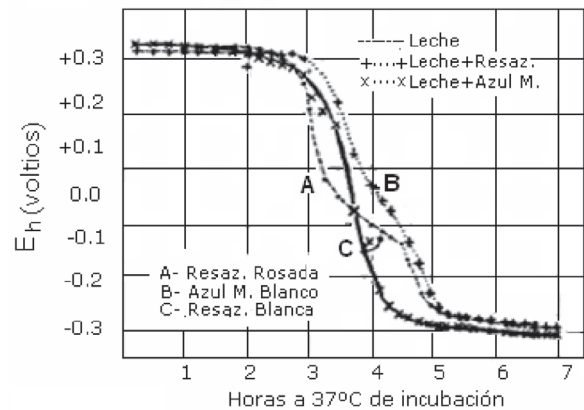
El Azul de Metileno evalúa la cantidad aproximada de bacterias en la leche y, por tanto, la capacidad de conservación. El mecanismo del Azul de Metileno para valorar la calidad microbiológica está relacionado con la actividad reductora de las bacterias que en el proceso de respiración eliminan el Oxígeno disuelto en la leche y el colorante se reduce hasta que se elimina totalmente [6]. Cuando no implica un cambio de Oxígeno en la reducción, dos átomos de Hidrógeno están involucrados en la reacción. Es importante identificar el origen del Hidrógeno y qué sustancias lo forman para descartar que los sistemas de reducción no estén influenciados por bacterias [7].

Figura 1. Curvas de tiempo potencial de muestras de leche con Azul de Metileno



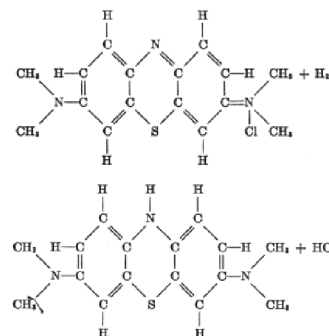
Fuente: adaptado de Thornton, H y Hastings, E. 1929

Figura 2. Curvas de tiempo potencial de muestras de leche con Azul de Metileno y Resazurina



Fuente: adaptado de Johns, C y Howson, R. 1940

Figura 3. Mecanismo de reducción del Azul de Metileno



Fuente: Thornton, H y Hastings, E. 1929

**Componentes de la leche que inciden en la reducción del Azul de Metileno.** La lactosa, la cual está presente en la leche en una cantidad del 5%, es un azúcar reductor y podría recibir alguna consideración como agente que contribuye en la reducción de los colorantes que se utilizan para evaluar la calidad en la leche. Pero se le ha dado especial importancia a un grupo de componentes, que han sido llamados “metabolitos”.

Algunos autores han estudiado el efecto de la Cisteína (metabolito) proveniente del Glutation, sobre la reducción del Azul de Metileno. Al adicionar una parte de Cisteína a 1000 partes de leche los resultados encontrados establecen caídas súbitas del potencial redox en la leche, alcanzado una decoloración completa del Azul de Metileno antes de una hora de incubación [7].

**Sistema de reducción en leche mastítica.** Nilsson, establece en sus estudios a partir del método de potenciometría directa, que muestras obtenidas asépticamente de cuartos individuales en los cuales se diagnosticó mastitis, condujeron a una caída del potencial notablemente, en comparación con leche de ubres sanas. Este sistema es lo bastante fuerte para producir una caída en la variación del potencial entre 50 a 400 mv.

**Papel de las enzimas y sustancias donadoras de hidrógeno.** La leche está constituida por diversos sistemas biológicos de reducción propios de ella como las enzimas, y otros, influenciados por el crecimiento de los microorganismos. Ambos contribuyen al descenso del potencial, debido a formación de iones  $H^+$  por la presencia de sustratos donadores de Hidrógeno para las enzimas y metabolitos secundarios en la descomposición de los constituyentes de la leche por la acción de las bacterias. El potencial redox en sistemas biológicos es denotado por  $E_0$ . El valor de  $E_0$  es determinado en casos de sistemas de reducción que implican iones  $H^+$ .

En un estudio llevado a cabo por Nilsson llamado “rol de la xantino oxidasa”, investigó los cambios de potencial redox que ocurren en leche normal y leche mastítica adicionando diferentes donadores de hidrógeno; estas sustancias son capaces de activar los sistemas enzimáticos de la leche como es el de la Xantino oxidasa, el cual genera marcadas caídas en el potencial en la leche para ambos casos [8].

Los sistemas de reducción que no están afectados por la presencia de bacterias pueden contribuir a la

caída del potencial en la leche, según su valor de  $E_0$  (ver cuadro 1).

Se ha demostrado la existencia de una alta concentración de la enzima Xantino oxidasa en leche mastítica que en leche normal, cuando se hizo la prueba de la solución de Scharinger, la cual fue reducida más rápidamente que la leche normal. La solución de Scharinger está constituida por Azul de Metileno y formaldehído, siendo este último el donador para la Xantino oxidasa [8].

**Influencia del contenido de grasa y leucocitos sobre la capacidad de reducción de la leche.** En investigaciones se encontró que un contenido alto de grasa fue asociado con una mayor rapidez en la caída del potencial en leche mastítica, esto se debe evidentemente a los siguientes factores: la xantino oxidasa está ligada a la grasa y ésta por lo tanto, presente en mayor concentración en muestras con un alto contenido de la misma y; la superficie sobre la cual la reacción puede ocurrir es mayor en leche rica en grasa que en leche con poca grasa. Por consiguiente el sistema Xantín oxidasa, está concentrado principalmente en la superficie de la membrana de los glóbulos grasos [8].

**Cuadro 1.** Sistemas de óxido reducción y sustancias que posiblemente influyen en el potencial de la leche cruda.

Enzima	Sustrato	$E_0$ a pH 7
Dehidrogenasas	Alcohol etílico	-0,090 – 0,16
	Ácido láctico	-0,18
	Ácido málico	-0,10
	Glucosa	-0,45
	Ácido glutámico	-0,03
	Ácido succínico	0,01
	Hipoxantina, aldehídos	-0,37
	Xantino	-0,37
Oxidasa	Citocromo C reducido	0,27
	Ácido ascórbico	0,078-0,05
Peroxidasas (requieren $H_2O_2$ )	Aminas aromáticas y fenoles en la leche.	-0,27
	Citocromo reducido	-0,208
	Glutation	-0,233

Fuente: Nilsson, G. 1959

En estudios anteriores se creía que las propiedades de reducción de leche mastítica de bajo contenido bacteriano son debidas al alto contenido de leucocitos en la leche. Se demostró que los leucocitos no son directamente responsables del fenómeno de reducción, como se creía anteriormente. Se practicó un ensayo en el cual se extrajeron leucocitos de un cuarto afectado y se adicionó la muestra a leche obtenida de un cuarto sano; ninguna mostró caída en el potencial. La explicación está en que la presencia de leucocitos en la leche, produce un aumento cuantitativo de la transferencia de otras sustancias de la sangre a la leche durante su síntesis por parte de los alvéolos. [8].

**Propiedades de reducción de los microorganismos de la mastitis.** Entre los microorganismos que causan la mastitis los más comunes son los estreptococos, estafilococos y coliformes. Los estreptococos son los responsables, por lo menos del 85% de los casos de mastitis crónica. A diferencia de los estreptococos ácido lácticos, los estreptococos de la mastitis son por regla general los hemolíticos. Se demostró que puede ocurrir una caída en el potencial en un cultivo bacterial de estreptococos hemolíticos sí se adiciona catalasa, aunque estos tienen propiedades de reducción extremadamente débiles. Puesto que leche con mastitis contiene relativamente gran cantidad de catalasa, es bastante comprensible que los constituyentes de la leche sean un buen medio para el desarrollo de microorganismos hemolíticos conforme a lo establecido por Hobbs [9].

Con otro tipo de microorganismos se han realizado ensayos para identificar la capacidad de reducción de cepas puras de microorganismos como el *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*, los cuales demostraron que, cerca de 5000 microorganismos por mililitro fueron necesarios para obtener una caída en el potencial.

En los casos de microorganismos coliformes causantes de mastitis, mostraron una capacidad de reducción marcada. Así, por ejemplo en los casos de mastitis debido a *E. coli* y posiblemente a estafilococos, se puede pensar que la capacidad de reducción de leche mastítica a 37 °C puede ser en parte de origen bacterial, si los organismos patógenos están presentes en gran número [8].

**Estudios de Resazurina.** Ha sido establecido por Garvie y Rowlands, que uno de los mayores factores que contribuyen a la inexactitud de las pruebas colorimétricas como un significado de la calidad bacteriológica, evaluada en la leche cruda, es la variación en la capacidad de reducción de diferentes bacterias y la respuesta que tienen con los test de Resazurina, Azul de Metileno y otras pruebas de calidad. El origen de la disimilitud podría estar en la interacción total de la flora normal de la leche cruda resultando en una aceleración o retardo de la reducción de los colorantes [10,11].

Para determinar la capacidad de reducción de la Resazurina frente a determinadas cepas, Greene y Jamison aislaron bacterias de una muestra de leche normal utilizando cultivos apropiados, las cepas obtenidas fueron *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus lactis*. Las cepas puras se suspendieron en soluciones salinas manejando tres concentraciones diferentes., como resultado se encontró un sinergismo entre los diferentes tipos de bacterias dependiendo de la cantidad del inóculo y en algunos casos de la actividad de reducción de los microorganismos. Como sucede con *B. subtilis* y *P. fluorescens*. Algunas veces existe una leve reducción como *P. fluorescens* o lo contrario una fuerte capacidad de reducción con *S. Lactis* [11].

**Estudios comparativos de Resazurina y Azul de Metileno.** Los estudios comparativos de Resazurina y Azul de Metileno como indicadores de la calidad bacteriológica han sido material de estudio por diferentes investigadores. Se ha encontrado que el test de Resazurina en "un hora" es más confiable que el test de Azul de Metileno en leche que contiene gran número de microorganismos, ya que existe dificultad para distinguir matices de coloración de la resazurina durante el periodo de reducción. Por consiguiente se ha tomado como referencia el tiempo de reducción de la Resazurina en la coloración rosa; Johns y Howson establecen que existe una muy buena correlación entre los tiempos de reducción para Resazurina y Azul de Metileno, la proporción es de 3 a 4. Consecuentemente el test de Resazurina, usando el color rosa como punto final puede ser considerado tan preciso como el test de Azul de Metileno como indicador del contenido bacterial de la leche. Además el tiempo de reducción de la Resazurina es menor que el del Azul de Metileno [3].

Según Barrett y Keenan, el uso de la Resazurina da más información de la calidad de la leche que cualquier otro indicador químico por presentar una escala de coloración

ción. El propósito del trabajo de los autores fue presentar datos que indicaran, que el test de Resazurina cuenta con una propiedad adicional como indicador de calidad por encima del Azul de Metileno que está relacionado con sus coloraciones. Esta prueba tiene a favor que el tiempo de incubación es más corto y está asociado a un diagnóstico al microscopio en la rutina del control de calidad de la leche cruda. En un ensayo con 220 muestras para comparar la reducción de la Resazurina y el Azul de Metileno se encontró que en muchos casos no se afectó el tiempo de reducción del Azul de Metileno. Esto puede ocurrir por el hecho de que los estafilococos tienen una particular aptitud para reducir la Resazurina en comparación con otros tipos de bacteria encontrados en la leche [4].

Igualmente, el test de Resazurina es comparado con el de Azul de Metileno con respecto al conteo en placa. De los resultados obtenidos, establecen los autores que los datos como la calidad bacteriana de la leche obtenida en una hora de incubación con Resazurina, son completamente confiables como el test de Azul de Metileno en 7 horas de incubación (ver cuadros 2, 3). Además la Resazurina es más sensible a leches patológicas y fisiologías anormales de la ubre que el Azul de Metileno [4].

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Lugares a muestrear

Dentro de la Asociación de Productores de Leche de Sotará – ASPROLESO, existen cuatro rutas de acopio de leche, la ruta Paispamba, Ullucos, Chapa y Piedra de León; el número de productores son: 10, 13, 50 y 43 respectivamente.

### Toma de muestras

Las muestras de leche cruda se tomaron en recipientes esterilizados de vidrio ámbar de capacidad de 100 mL. Las muestras fueron transportadas en caja de embalaje refrigerada que permitió conservarlas para su análisis en el laboratorio.

Las muestras de leche se tomaron en el momento de la entrega de leche al transportador (en ruta de recolección), en la recepción en el centro de acopio (planta de enfriamiento) y posteriormente en el tanque de almacenamiento, de una mezcla homogénea y representativa.

**Cuadro 2.** Comparación del color de Resazurina en una hora con el conteo estándar en placa

Nº de muestras	Color de resazurina	Conteo estándar en placa UFC/mL				
		< 25.000	25.000-50.000	50.000-100.000	100.000-200.000	>200.000
220	Azul	160	32	14	9	5
30	Rosado púrpura	7	12	3	3	5
32	Rosado claro	17	10	-	2	2
14	Rosado	8	-	2	2	2
7	Rosado oscuro	4	1	-	-	2
2	Blanco	1	-	-	-	1

Fuente: Barrett, W y Keenan, J. 1938

**Cuadro 3.** Comparación del tiempo de reducción del Azul de Metileno con el conteo estándar en placa

Nº de muestras	T.R.A.M	Conteo estándar en placa UFC/mL				
		< 25.000	25.000-50.000	50.000-100.000	100.000-200.000	>200.000
253	7 horas	174	48	13	12	6
19	6 horas	6	5	3	3	2
7	5 horas	2	1	2	-	2
23	< 5 horas	4	5	2	3	8

Fuente: Barrett, W y Keenan, J. 1938

## Equipos

Incubadora o baño de maría a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  con control y uso de termómetro calibrado periódicamente, autoclave para la esterilización de materiales, y balanza analítica.

## Materiales y reactivos

Tubos de vidrio de tapa rosca estériles, pipetas de 10 mL estériles y secos, pipeta de 1 mL estéril y seco, propipetas, matraces aforado de 1000mL y de 100 mL estériles, frascos de vidrio ámbar con tapa, gradillas y neveras de icopor. Para la prueba de Reductasa (TRAM) y Resazurina, se usó una concentración de  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  de agente activo. Las cantidades fueron pesadas en balanza analítica con precisión de 0.1 mg.

## Análisis de laboratorio

Las muestra recogidas se analizaron en el laboratorio de control de calidad de ASPROLESO, siguiendo los cuidados del protocolo operativo estándar de muestreo para la prueba de Reductasa (T.R.A.M) y la prueba de Resazurina en una hora [6,12].

## Análisis de datos.

**Relación entre las pruebas de Resazurina y tiempo de reducción del Azul de Metileno.** Para el objeto de este estudio y los estadísticos a desarrollar, se elaboró una escala común a ambas pruebas (ver cuadro 4), para facilitar la aplicación de las pruebas pareadas de la t-student y rangos con signo de Wilcoxon. Para establecer la relación entre las dos pruebas se tiene en cuenta estudios realizados por Barrett y Keenan donde se establecen 6 escalas de valoración para la prueba de Resazurina y además se hace una comparación del tiempo de reducción del Azul de Metileno con las diferentes coloraciones de la Resazurina.

**Planteamiento de la hipótesis.** La relación de las pruebas se determinó mediante el análisis estadístico de los datos con el fin de probar la hipótesis: "las dos pruebas colorimétricas se relacionan al medir la calidad higiénica de la leche cruda".

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \quad \text{Ec. (1)}$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \quad \text{Ec. (2)}$$

**Cuadro 4.** Escala de valoración única que relaciona la prueba de Azul de Metileno y la de Resazurina.

Escala única	Azul metileno (Tram)	Resazurina
7	7-8	6
6	6	5.5
5	5	5
4	4	4,5
3	3	3,5 – 4
2	2	2,5 – 3
1	1	1,5 – 2
0,5	0,5	0 - 1

Fuente: Los autores

Donde  $\mu_1$  y  $\mu_2$  corresponden a las medias pareadas para las pruebas de Azul de Metileno y Resazurina en una hora.

**Incidencia del transporte en la calidad higiénica de leche cruda.** Para determinar el efecto causado por el transporte en la calidad higiénica de la leche cruda acopiada por ASPROLESO, se tomaron muestras de leche en ruta de recolección y en planta de enfriamiento; a la vez se eligieron al azar los proveedores a los cuales se les realizaría seguimiento en el proceso de acopio.

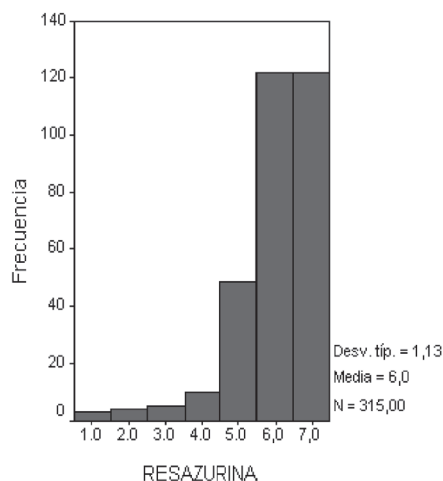
Para evaluar la incidencia del transporte en los dos sitios de muestreo, se aplicó el análisis estadístico de medias marginales, donde la variable observada fue la calidad higiénica de la leche cruda, medida con el tiempo de reducción del Azul de Metileno (T.R.A.M).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de calidad de las pruebas conjuntas de Resazurina en 1 hora y tiempo de reducción de Azul de Metileno aparecen en los siguientes histogramas de frecuencias con medias 6, 5,4 y desviaciones estándar de  $\pm 1,13$ ,  $\pm 1,45$  para las dos pruebas respectivamente.

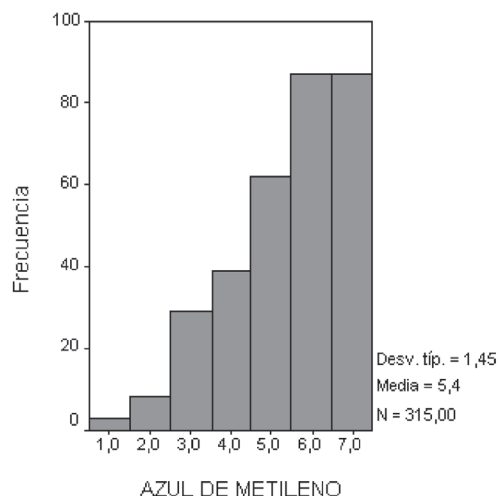
Como se observa en los gráficos, la desviación para la prueba de Azul de Metileno es superior, lo cual sugiere que este parámetro es de mayor exigencia para evaluar la calidad higiénica de la leche cruda.

**Figura 4.** Histograma para la prueba de Resazurina en una hora



Fuente: Los autores

**Figura 5.** Histograma para la prueba de Azul de Metileno



Fuente: Los autores

Los datos fueron corregidos a la escala de valoración en los que se evalúa las pruebas estadísticas para determinar la diferencia o semejanza entre las pruebas como sigue.

Al evaluar las dos pruebas de calidad higiénica con los estadísticos de la t-student y con el de rangos de signo de Wilcoxon, se obtuvo  $p < 0.001$  para los estadísticos de prueba, lo cual sugiere que la hipótesis establecida "las dos pruebas colorimétricas se relacionan al medir la calidad higiénica de la leche cruda" es rechazada en este estudio, esto se debe a que el tiempo utilizado en la prueba de Resazurina (una hora), no es el suficiente para que sufra un cambio considerable en el potencial

de oxido-reducción por la presencia de bacterias. (Ver cuadro 5 y 6).

También es sabido que la leche tiene la capacidad de auto conservarse durante un tiempo cercano a las dos horas después de ser obtenida en el ordeño, y que está asociada a la acción bactericida del sistema Lactoferrina - Lacto-peroxidasa.

Como lo afirma Johns [2] en su estudio, el test de Resazurina en una hora es menos confiable que el test de azul de metileno y se dificulta comparar los cambios en las tonalidades de coloración para la Resazurina, el autor prefirió hacer un cambio en la prueba usando como parámetro el tiempo de reducción de la Resazurina hasta el estado de coloración rosa encontrando una buena correlación entre el test de Resazurina y azul de metileno. Incluso en estudios que comparan variantes del test de Resazurina prolongando el tiempo de reducción por 3 horas, y tomando como referencia una tonalidad intermedia entre el color azul y el color rosa, establecen un mejor resultado y aproximación de la prueba modificada con el conteo en placa [13]. Otros estudios relacionados con la prueba de Resazurina, le confieren una propiedad adicional que no la tiene el azul de metileno, relacionando los cambios en la coloración de ésta como una prueba diagnóstica para establecer las posibles fuentes de contaminación microbiana de la leche cruda [3]. Esta última propiedad se debe considerar cuando se pretenda identificar el problema de calidad higiénica en los hatos lecheros.

Observando las figuras 6 y 7 donde se resume la información de las cuatro zonas de acopio, en ruta y planta; se puede concluir que las muestras tomadas en ruta reflejan una calidad de buena a excelente utilizando ambas pruebas, en la planta de acopio la calidad disminuye, siendo la prueba de azul de metileno más selectiva en este rango.

El cambio de valoración es marcado pasando de ruta a planta, fenómeno debido al almacenamiento de la leche cruda, factores ambientales y de malas prácticas en el ordeño, que en conjunto desmejoran notablemente la calidad higiénica de la leche durante su transporte.

el azul de metileno es capaz de identificar leches de mala calidad desde el ordeño, mientras que la Resazurina sólo la detecta en planta, esto debido a que el tiempo de incubación es superior para la prueba de reductasa.



**Cuadro 5.** Estadísticos para muestras relacionadas t-student

Relación	Diferencias relacionadas					Valor T	Grados de libertad	Significancia
	media	Desv.	Error	95% Int. Conf. Dif.				
				inferior	superior			
Azul de metileno-Resazurina	0,616	1,433	0,081	0,457	0,775	7,629	314	< 0,001

Fuente: Los autores

Int. Conf. Dif. = intervalo de confianza para la diferencia

**Cuadro 6.** Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Relación	Rangos	N	Rango promedio	Suma de rangos	Valor Z	Sign
Azul de metileno-Resazurina	Negativos	154 <sup>a</sup>	117,27	18059,00	-7,062	< 0.001
	Positivos	62 <sup>b</sup>	86,73	5377,00		
	Empates	99 <sup>c</sup>				
	Total	315				

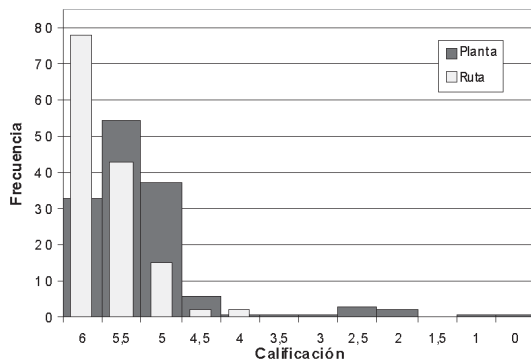
Fuente: Los autores

Azul de metileno < resazurina

Azul de metileno > resazurina

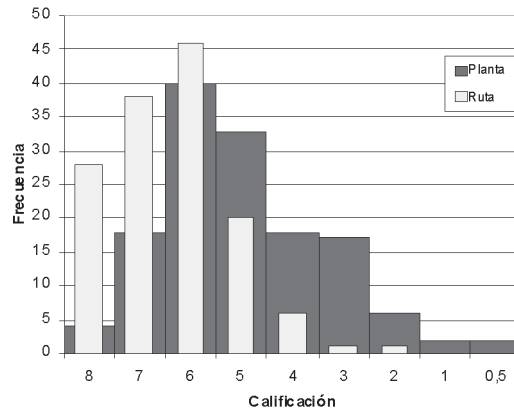
Azul de metileno = resazurina

**Figura 6.** Calificaciones de Resazurina para ruta y planta de acopio en las cuatro zonas de recolección de Febrero a Junio de 2007.



Fuente: Los autores

**Figura 7.** Calificaciones de Azul de Metileno para ruta y planta de acopio en las cuatro zonas de recolección de Febrero a Junio de 2007.



Fuente: Los autores

En vista de que se encontró una diferencia entre las pruebas y considerando que la prueba de azul de metileno presenta un rango más amplio de evaluación, únicamente se le dio importancia a la prueba de azul de metileno para realizar el análisis estadístico entre zonas y sitios de muestreo. Se clasificaron las muestras pareadas, es decir, muestras de un mismo productor tomadas en sitio de entrega y planta de acopio resultando 70 muestras para análisis entre ambos sitios de muestreo por cada zona.

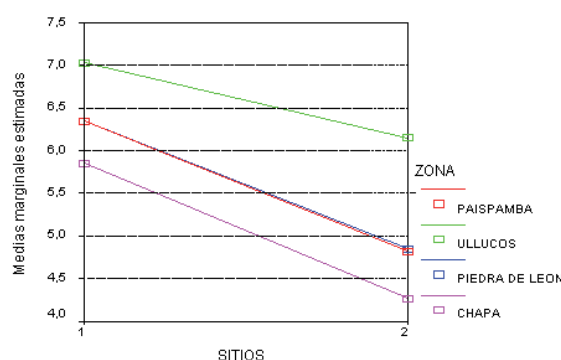
Como se puede observar en la figura 8 y en los datos del cuadro 7 existe una tendencia de las medias marginales evaluadas para la calidad higiénica de la leche cruda por sitios de muestreo, con un comportamiento decreciente para todas las zonas, aunque es

más marcado para las zonas Chapa, Piedra León y Paispamba.

La zona de Ullucos tiene en promedio la mejor calificación de calidad de leche entregada en la ruta, además presenta menos variación entre muestras tomadas en ruta y en planta de acopio, esto indica que existe una mejor conservación de la leche. También tiene un comportamiento independiente a las demás zonas por presentar unas condiciones climáticas de bajas temperatura de 8°C en promedio y el tiempo de transporte se aproxima a 3 horas.

En la zona de Chapa la calidad higiénica de la leche está por debajo de las otras zonas iniciando con una calificación inicial promedio de 5,85 y una calificación final de 4,3; este cambio puede comprometer la calidad higiénica de la leche de las demás zonas que se almacenan en el tanque de enfriamiento.

**Figura 8.** Medias marginales estimadas por sitios de muestreo para cada zona



Fuente: Los autores

## CONCLUSIONES

La comparación de las dos pruebas permitió encontrar diferencias significativas entre las pruebas de resazurina y azul de metileno que llevó a ajustar la calidad de la leche acopiada en la asociación, mediante la identificación de nuevos casos de baja calidad higiénica en la leche que no se habían detectado con la prueba de resazurina en productores que se encontraban próximos a la planta de acopio o productores en los que se hacía el muestreo de leche recién ordeñada.

**Cuadro 7.** Interacción entre los datos por zonas y sitios de muestreo mediante medias marginales estudiadas

Zona	Sitios	Media	Error típ.	Intervalo de . conf. al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Paispamba N=70	1	6,343	0,191	5,966	6,720
	2	4,829	0,246	4,342	5,315
Ullucos N=70	1	7,029	0,191	6,656	7,406
	2	6,143	0,246	5,656	6,630
Piedra de León N=70	1	6,343	0,191	5,966	6,720
	2	4,843	0,246	4,356	5,330
Chapa N=70	1	5,857	0,191	5,480	6,234
	2	4,271	0,246	3,785	4,758

Fuente: Los autores  
1 ruta de recolección  
2 planta de acopio

El patrón del tiempo de reducción de azul de metileno permite evaluar la calidad higiénica de la leche en un rango más amplio diferenciándose los cambios de calidad y no se presta para sesgar una calificación específica como si lo hace la prueba de resazurina en una hora usando como referencia los cambios en la tonalidad del colorante.

Es preciso considerar si la modificación de la prueba de resazurina, tomando como parámetro el tiempo de decoloración de la misma y no los cambios en los estados de coloración, mejore los resultados como parámetro en la evaluación de calidad higiénica de la leche cruda.

## REFERENCIAS

- [1] KEATING, Patrick y RODRÍGUEZ, Homero. Introducción a la lactología. México : Limusa Noriega Editores, 2004. p. 75-77
- [2] JOHNS, C y HOWSON, R. Potentiometric Studies with Resazurin and Methylene Blue in Milk. En : Journal Dairy Science. Vol.23 (1940); p. 295-302
- [3] BARRETT, W.; RUTAN, H. y KEENAN, J. The resazurin test-its use and practicability as applied to the quality control of raw milk. En : Journal Dairy Science. Vol.20 (1937); p. 705-709.
- [4] THORNTON, H y HASTINGS, E. Studies on oxidation-reduction in milk. Oxidation-reduction potentials and the mechanism of reduction. En : Journal Of Bacteriology, Vol. 18 No 5 (1929); p 293-317
- [5] UNIVERSIDAD DEL ZULIA. Introducción al control de la calidad de la leche cruda guía práctica. [artículos en línea]. Maracaibo. 2007. [citado el 15 de agosto de 2007]. Disponible en Internet: // members.tripod.com.ve/tecnología/ introducción. htm.
- [6] KIRK, Ronald. EGAN, Harol. Composición y análisis de los alimentos de Pearson. 2ed. México : Compañía Editorial Continental, 1996. p. 607-609
- [7] THORNTON, H y HASTINGS, E. Studies on oxidation-reduction in milk. Oxidation-reduction potentials and the mechanism of reduction. En : Journal Of Bacteriology, Vol. 18 No 5 (1929); p 293-317
- [8] NILSSON, G. Reducing properties of normal and abnormal milk y their importance in bacteriological grading of milk. En : Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 23, No 2, (June 1 1959); p 41-47
- [9] HOBBS, B. The part played by bacteria in the reduction of methylene blue in milk. En : Journal Dairy Research Vol. 10, (1939); p 35-38
- [10] GARVIE y ROWLANDS. The role of microorganisms in dye relation and keeping quality test. En : Journal Dairy Research. Vol. 19 (1952); p. 263
- [11] GREENE, V y JAMISON, R. Influence of bacterial interaction on resazurin reduction times. En : Journal Dairy Science. Vol.42 (1959); p. 1089-1100
- [12] CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNA-CIONAL. Protocolos operativos estándar para red de laboratorios de ensayo de la cadena láctea. Bogotá : Le ´Print Club Espress, 1999. 40 p
- [13] Nixon, M y Lamb, A. Resazurin triple reading test for grading de quality of raw milk. En : Canadian Journal of Comparative Medicine. Vol. 8, No 1 (January, 1945)