

## Aplicación de un equipo de campaña para la ejecución del Test de fosfatasa de Scharer

Por A. RIVA, E. L. SCHIAVONE y E. VADILLO

---

En una comunicación anterior se consideró el test de la fosfatasa de Kay y Graham para fiscalizar el proceso de la pasteurización de las leches.

Este test presenta algunos inconvenientes que han limitado su uso a los laboratorios que cuentan con una organización especializada y aún en éstos su ejecución presenta algunas dificultades, resultando demasiado larga y complicada para análisis de rutina.

Además hay varias objeciones que hacer a dicho test, algunas de las cuales se refieren al reactivo de Folin y Ciocalteu, el cual, según se ha comprobado, carece de especificidad, reaccionando con muchos sustitutos de los fenoles y aún con el estaño (metal que puede provenir de los recipientes que contienen la leche) y con el hierro al estado ferroso. En el caso de las leches acidificadas se puede encontrar productos que reaccionan también con el reactivo de Folin y Ciocalteu. También se ha indicado que al acidificarse o descomponerse la leche durante su almacenamiento, se obtenía un aumento en la intensidad del tinte, con el método de Kay y Graham, debido a la acción de ciertos microorganismos o a la descomposición de las proteínas, que liberan como se señala más arriba, cuerpos que reaccionan con el reactivo fosfomolibdico.

En estas condiciones una leche perfectamente pasteurizada, puede ser clasificada erróneamente como no siéndolo.

Estas consideraciones han llevado a algunos autores y entre ellos a Scharer, a ensayar otros indicadores del fenol, empleando el 2-6-dibromo-quinona-cloro-imida, el cual es enteramente satisfactorio. La sensibilidad de este reactivo para el fenol es de una parte en 20.000.000 y permite el desarrollo de la coloración azul aún en presencia de las proteínas y grasas de la leche.

El fundamento del método propuesto por Scharer consiste, como el de Kay Graham, en la apreciación de la fosfatasa residual presente en la leche después del calentamiento, por la actividad de di-

cha enzima frente a un éter fosfórico, revelable por la liberación de fenol.

En el presente trabajo se ha aplicado el test de la fosfatasa de Scharer, el denominado test rápido, utilizando el equipo de campaña de la R. P. Cargille de New York, la cual ha preparado un equipo portátil con todo el material necesario para ejecutar la prueba, lo que permite realizar los exámenes fuera del laboratorio, en las usinas y en los lugares donde se depositan o expenden los productos lácteos.

La sencillez de este procedimiento ha hecho que su uso se extendiera grandemente, pues sólo es necesario el empleo de dos soluciones, substrato e indicador, que se preparan, como se verá más adelante, disolviendo las sustancias convenientes (presentadas en comprimidos) en volúmenes determinados de solventes adecuados. Tiene además la ventaja de que la reacción se realiza dentro de un solo tubo, sin eliminar sustancia alguna, a diferencia del método original o método lento en el que es necesario efectuar un precipitado de los prótidos lácteos con acetato de plomo, seguido de una ulterior filtración para separación de los mismos.

El equipo consta: de diez tubos con tapón de goma con sus correspondientes soportes (tubos aforados: 5,5½ y 7½ c. c.).

Dos tubos con colores standard de 2 y 5 unidades azules respectivamente.

Frascos goteros. Frascos para alcohol butílico. Filtro de luz. Varilla de metal. Cuenta-gotas. Reactivos necesarios.

#### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Solución B. Q. C. (Indo-Phax en el equipo Cargille): Se disuelve un comprimido de 2-6-dibromo-quinona-cloro-imida, reactivo denominado B. Q. C. en 5 c. c. de alcohol etílico de 96°C, triturando con la varilla metálica.

Solución Buffer (Phox-Phax en el equipo Cargille): constituida por borato de sodio ( $\text{Bo}_4\text{O}_7\text{Na } 10 \text{ H}_2\text{O}$ ) e hidrato de sodio y fenilfosfato disódico. Disolver un comprimido en 5 c. c. de agua destilada en uno de los tubos aforados. Agregar dos gotas de solución B. Q. C. (recientemente preparada). Dejar en reposo 5 minutos, agregar 2 c. c. de alcohol butílico normal neutro para extraer el indofenol, el cual se revela por una coloración azulada, agitando y dejando en reposo hasta la separación completa del alcohol.

Luego se procede a la eliminación total de alcohol para lo cual es útil el empleo de un cuenta gotas de punta curva con el que

se puede extraer hasta las porciones que se adhieren a las paredes del tubo.

De este modo se elimina de la solución el fenol libre que pudiera contener; luego se vierte en el frasco aforado de 50 c. c. y se completa a este volumen con agua destilada.

#### TÉCNICA DEL TEST

*Primer tiempo:* Colocar en los tubos marcados citados anteriormente 5 c. c. de la solución Buffer.

*Segundo tiempo:* Completar con la muestra de leche (perfectamente agitada para su homogenización) hasta la marca 5,5 c. c. Debe usarse una pipeta para cada muestra distinta.

*Tercer tiempo:* Agitar por espacio de un minuto.

*Cuarto tiempo:* Incubar en baño maría a 37°C durante 10 minutos.

*Quinto tiempo:* Sacar del baño maría y agregar seis gotas de la solución B. Q. C.

*Sexto tiempo:* Agitar vigorosamente, dejando luego en reposo durante 5 minutos, tiempo suficiente para dar margen a la producción del color en toda la extensión del tubo. La leche cruda da inmediatamente un color azul intenso.

En los casos de leches deficientemente pasteurizadas el color será más o menos fuerte según sea la deficiencia. En estos casos, para apreciar correctamente la intensidad del color azul producido, se continuará el análisis en la siguiente forma:

*Séptimo tiempo:* Agregar alcohol butílico normal hasta llegar a la tercera marca 7,5 (2 c. c.). Invertir luego el tubo suavemente durante 10 veces cuidando de dejar a las burbujas subir a la superficie después de cada inversión. Si se invierte rápidamente se produce una emulsión que tarda en separarse. En esta forma todo el color azul producido por la reacción quedará extractado y concentrado en la napa formada por el alcohol butílico. Este color se compara entonces con los standards del equipo.

Es conveniente dejar el tubo después de cada agitación en posición horizontal, levantándolo luego suavemente por un extremo.

Las soluciones del substrato Buffer y del indicador una vez preparadas se conservan aproximadamente 48 horas. Es necesario efectuar cuidadosamente el lavado de los tubos, pipetas y goteros antes

de realizar las determinaciones. Debe emplearse exclusivamente alcohol butílico normal como aconsejan los autores del método.

Siempre debe efectuarse un control de leche hervida lo que dará la pauta del estado de conservación y limpieza de los reactivos y aparatos empleados.

Los resultados obtenidos deben interpretarse del modo siguiente:

Una leche correctamente calentada a 63°C durante 30 minutos debe dar un extracto alcohólico casi incoloro o que tenga a lo sumo una ligera tonalidad azul-verdosa muy inferior, desde luego, a la del tubo standard N° 2.

Este standard N° 2 representa el máximo de coloración permitido para una leche correctamente pasteurizada.

Toda leche que dé una coloración superior a dicho standard debe considerarse como mal pasteurizada. Si la coloración fuera aún superior a la del tubo standard N° 5, indicará graves deficiencias en el proceso de pasteurización.

Expuestos los fundamentos del método, la preparación de los reactivos, las precauciones necesarias para su correcta ejecución y la interpretación que debe darse a los resultados que con él se obtengan, se mostrarán algunas de las conclusiones a que llega Scharer por la aplicación de su método original:

1° Treinta y cuatro leches crudas de vaca dieron quinientas o más unidades de fosfomonestearasa (cada unidad de fosfomonoes-tearasa equivale a un milésimo de miligramo de fenol) (una gamma).

2° Las mismas leches pasteurizadas correctamente, no produjeron en ningún caso un color indicador de más de 2,5 unidades de fosfomonoes-tearasa.

3° Distintas temperaturas de calentamiento dieron los resultados que se detallan en el cuadro siguiente:

Temperaturas		Valores hallados
Grados F	Grados C	
138°	58.8	entre 250 y 50 unidades
140,5°	60.2	entre 100 y 50 unidades
142°	61.1	entre 10 y 50 unidades
143°	61.6	entre 2,5 y 50 unidades

4º Los resultados obtenidos en la investigación de agregados de leche cruda a una leche debidamente pasteurizada se muestra en el cuadro que sigue:

Porcentaje de leche cruda agregada	Valores hallados
0,0 .....	hasta 2,5 U.
0,2 .....	hasta 5 U.
0,5 .....	hasta 5 U.
1,0 .....	hasta 10 U.
2,0 .....	hasta 20 U.
5,0 .....	hasta 50 U.
10,0 .....	hasta 100 U.

Nuestras primeras experiencias se efectuaron calentando muestras de leche cruda a 63, 60, 58 y 56°C durante períodos de 10, 20 y 30 minutos, utilizando el mismo sistema de calentamiento descrito en otra oportunidad; los resultados obtenidos están consignados en el cuadro N° 1.

CUADRO N° 1. — *Test de Scharrer*

En leche calentada a:

Temperatura	Tizepo	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª	19ª	20ª		
63°	30'	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	
	20'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	
	10'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	
60°	30'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
	20'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
	10'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
58°	30'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
	20'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
	10'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
56°	30'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
	20'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
	10'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
Control cruda . .		+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U

Los resultados de las experiencias detalladas en el cuadro N° 1, pueden observarse en el siguiente resumen:

Temp.	Tiempo	N° de exámenes	Resultados:	
			menos de 2 Unid.	más de 2 Unid.
56°C	10'	20	0	20
56°C	20'	20	0	20
56°C	30'	20	0	20
58°C	10'	20	0	20
58°C	20'	20	0	20
58°C	30'	20	0	20
60°C	10'	20	0	20
60°C	20'	20	0	20
60°C	30'	20	0	20
63°C	10'	20	0	20
63°C	20'	20	0	20
63°C	30'	20	20	0

De estos resultados se desprende que el calentamiento a 60, 58 y 56°C aún mantenido durante 30 minutos, dió en las 20 muestras examinadas para cada temperatura y tiempo, colores superiores al del tubo standard N° 2. Lo mismo sucede cuando el calentamiento a 63°C se mantiene durante 10 y 20 minutos. En todos estos casos, por lo tanto los resultados indican leches mal pasteurizadas.

En cambio las muestras calentadas a 63°C durante 30 minutos dieron siempre colores inferiores al del tubo standard N° 2, indicando por lo tanto pasteurización correcta.

Con el propósito de apreciar más exactamente la sensibilidad del test en cuanto a temperatura y duración del calentamiento, se efectuó una nueva serie de experiencias, cuyos detalles se ven en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 2. — *Test de Scharer*

En leches calentadas a:

Temperatura	Tiempo	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª	19ª	20ª
63°	30'	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U
	25'	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U
	20'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
62°	30'	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U
	25'	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U	Entre 2y5 U
	20'	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U
Control cruda..		+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U



Los resultados de esta segunda serie de experiencias se resumen en el cuadro siguiente:

Temp.	Tiempo	Nº de exámenes	Valores hallados:		
			menos de 2	entre 2 y 5	más de 5 U.
63°C .....	30'	20	20	0	0
63°C .....	25'	20	0	20	0
63°C .....	20'	20	0	0	20
62°C .....	30'	20	0	20	0
62°C .....	25'	20	0	20	0
62°C .....	20'	20	0	0	20
Control .....		20	0	0	20

Analizando los resultados consignados en este segundo cuadro, se deduce que:

1) El calentamiento a 62° aún mantenido durante 30 minutos dió valores superiores al del tubo standard Nº 2, indicando por lo tanto mala pasteurización.

2) El calentamiento a 63° durante 20 y 25 minutos dió el mismo resultado.

3) El calentamiento a 63° durante 30 minutos dió invariablemente valores inferiores al del tubo standard Nº 2, vale decir indicó correcta pasteurización.

Con el propósito de comprobar la sensibilidad del test en ensayo para revelar los agregados de leche cruda a leches calentadas a 63°C durante 30 minutos se efectuaron las experiencias detalladas en el cuadro Nº 3.

CUADRO N° 3. — *Test de Scharer*

En leche calentada a 63° — durante 30', — contaminada con leche cruda

Leche cruda	Leche calent.	Dilución	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª	19ª	20ª	
1 cc.	+ 99 cc.	1 ‰	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	
			Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	Entre	
1 »	+ 999 »	1 ‰/1000	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	2y5 U	
0,5 »	+ 999,5 »	1/2 ‰/1000	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	
0,1 »	999,9 »	1 ‰/1000	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	
Control leche cruda . . . . .			+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	+5 U	
Control leche calentada . . . . .			-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U	-2 U

Los resultados de esta experiencia se resumen así:

Cantidad de leche cruda agregada %	Nº de expe- riencias	Valores hallados:		
		menos de 2	entre 2 y 5	más de 5
0,0 .....	20	20	0	0
0,01 .....	20	20	0	0
0,05 .....	20	20	0	0
0,1 .....	20	0	20	0
1 .....	20	0	0	20
Control leche cruda ...	20	0	0	20

Por lo tanto se puede concluir que:

1) Contaminaciones de 1 % y de 1 ‰ con leche cruda son revelables por este test, pues se obtienen valores superiores al standard Nº 5 o comprendidos entre el número 2 y el número 5.

2) Agregados de 0,1 por mil y de 0,5 por mil, dieron siempre valores inferiores al standard Nº 2, es decir que no fueron revelables por el test.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las experiencias efectuadas permiten concluir:

1) La ejecución del test de fosfatasa de Scharer, aplicando un equipo de campaña para exámenes rápidos, da resultados similares a los obtenidos por el autor con el método original.

2) El test así aplicado se ha mostrado excelente para mostrar pequeñas deficiencias en el proceso de la pasteurización, dentro de los siguientes límites:

a) Diferencias desde un grado por debajo de los 63°, o defectos de tiempo desde cinco minutos en la duración del proceso, son seguramente indicados por el test.

b) Revela agregados a leches correctamente calentadas de pequeñas cantidades de leche cruda, con una sensibilidad de 1 por mil.

3) Por lo tanto este test se ha mostrado más sensible que el de Kay-Graham en la revelación de tales deficiencias.