

# DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ELIMINACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CINCO CONCENTRACIONES EN LECHE CRUDA

Puga-Torres, Byron\*; Morales-Arciniega, Samantha; Núñez-Naranjo, Luis; De la Torre-Duque, David; Aragón-Vásquez, Eduardo; Jurado-Taticuán, Silvia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, Jerónimo Leyton S/N y Gato Sobral, Quito, Ecuador.

## Resumen

La investigación se realizó para determinar el tiempo de eliminación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y su efecto en las características físico-químicas y microbiológicas en leche cruda. En el Ecuador, el uso de este conservante químico es prohibido por la NTE INEN 9. Se tomaron 12 muestras diarias: 6 con conservante (Bronopol) y 6 sin conservante; en ambos grupos existió una muestra testigo sin alteraciones, y se realizó 4 repeticiones. Las muestras de leche se obtuvieron mediante un Diseño Aleatorio Simple de bidones de recolección y se realizaron adulteraciones intencionales con  $H_2O_2$  en concentraciones de 0.5, 2, 5, 10 y 25 mg/l, luego se midió su presencia o ausencia con tiras colorimétricas cada hora. Los resultados indican que para la condición sin conservante se elimina el  $H_2O_2$  de las muestras en 0.5 mg/l una hora; 2 mg/l una hora; 5 mg/l 6 horas; 10 mg/l 7 horas y 25 mg/l 10 horas; para la condición con conservante se elimina en 0.5 mg/l 1 hora; 2 mg/l 1 hora; 5 mg/l 5 horas, 10 mg/l 6 horas; 25 mg/l 11 horas. Respecto al análisis físico-químico y microbiológico los resultados, por análisis de varianza, existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las variables acidez, crioscopia y conteo bacteriano; en las variables pH, sólidos totales, sólidos no grasos, grasa y proteína, no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Se muestra además que la adición de  $H_2O_2$  reduce la cantidad de

bacterias, lo cual no es aconsejable pues perjudica a microorganismos beneficiosos para la elaboración de derivados lácteos y enmascara la acidez de leche contaminada con bacterias.

**Palabras clave:** NTE INEN 9, leche cruda, peróxido de hidrógeno, tiras colorimétricas.

## DETERMINATION OF REMOVING TIME OF FIVE DIFFERENT CONCENTRATION OF HYDROGEN PEROXIDE ON RAW MILK

### Abstract

This research was developed to determine the time of removal of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and its effects on physicochemical and microbiological characteristics in raw milk. In Ecuador, the use of this chemical preservative on milk is forbidden by the regulation NTE INEN 9. Twelve samples of milk were taken daily: 6 with a preservative (Bronopol) and 6 without preservatives; there was a control sample without changes in both groups too, and 4 repetitions performed. The milk samples were obtained by a simple random design from milk drums and an intentional tampering with  $H_2O_2$  concentrations were performed using 0.5, 2, 5, 10 and 25 mg/l, and the existence or absence of hydrogen peroxide was measured with colorimetric strips every hour. The results indicate that the  $H_2O_2$  added on unpreserved samples, is removed by 0.5 mg/l one hour; 2 mg/l one hour; 5 mg/l 6 hours; 10 mg/l 7 hours and 25 mg/l 10 hours; and the  $H_2O_2$  added on samples with preservatives, is removed in 0.5

\* Correspondencia a: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Jerónimo Leyton S/N y Gato Sobral, Quito, Ecuador. e-mail: [bpuga@uce.edu.ec](mailto:bpuga@uce.edu.ec)

mg/l 1 hour; 2 mg/l 1 hour; 5 mg/l 5 hours; 10 mg/l 6 hours; 25 mg/l 11 hours. Regarding the physico-chemical and microbiological analysis results by analysis of variance, significant differences were shown ( $p < 0,05$ ) in the variables: acidity, bacterial counts and crioscopia; with the variables: pH, total solids, non-fat solids, fat and protein, no significant differences were shown ( $p > 0,05$ ). Also it is shown that the addition of  $H_2O_2$  reduces the amount of bacteria, which is not desirable because it threatens to beneficial microorganisms for the production of dairy products and masks the acidity of milk contaminated with bacteria.

**Keywords:** NTE INEN 9, raw milk, hydrogen peroxide, colorimetric strips.

## INTRODUCCIÓN

La conservación de la leche representa un problema de importancia esencial, principalmente con ganaderos que tienen que desafiar condiciones ambientales desfavorables viéndose impedidos de aplicar la refrigeración post ordeño, ya sea por razones técnicas, económicas, geográficas, y/o prácticas, especialmente en zonas en las cuales la producción lechera está en crecimiento. [1] En tal situación, la leche cruda se vuelve propensa a acidificarse por contaminación bacteriana, ya que las bacterias transforman la lactosa en ácido láctico, por lo que muchos productores recurren a métodos de conservación (aplicando conservantes químicos) para retardar la proliferación de bacterias y/o para disminuir la acidez, durante su transporte hasta las plantas de procesamiento. Uno de estos conservantes químicos es el peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ . [2] El uso del peróxido de hidrógeno en Ecuador está prohibido, de acuerdo con la NTE INEN 9:2012, Quinta Revisión; [3] no se permite que la leche contenga ninguna clase de conservantes (formaldehído, peróxido de hidrógeno, hipocloritos, cloraminas, dicromato de potasio, lactoperoxidasa adicionada), ni adulterantes (harinas, almidones, sacarosa, cloruros, suero de leche, grasa vegetal), neutralizantes, colorantes ni residuos de medicamentos veterinarios. Igualmente la Agencia Ecuatoriana para el Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) emitió la Resolución DAJ-20134661-0210,0213, el 21 de noviembre del 2013, [4] la cual faculta realizar el control de peróxido de hidrógeno, a través del método colorimétrico

con tiras de ensayo que permite verificar si se le ha añadido a la leche peróxido de hidrógeno y, en caso de existir muestras de leche que den positivo a dicha presencia, se procede al decomiso del lote. Sin embargo, se han encontrado problemas con el uso de esta técnica, pues al ser el peróxido de hidrógeno un producto muy volátil, esta característica hace que se encuentren falsos negativos en las pruebas que se realizan in situ (sin conservante) y en las muestras (con el conservante Bronopol) que son enviadas desde las diferentes Direcciones Provinciales de AGROCALIDAD. Ya que el peróxido de hidrógeno es utilizado para encubrir la calidad inferior de la leche producida en ambientes de higiene deficiente, esta leche representa un gran riesgo de salud pública y economía del país, poniendo en claro riesgo la seguridad y la salud de los consumidores. La presente investigación concierne tanto para la Autoridad Nacional Competente de Ecuador, como para laboratorios que realizan este tipo de ensayo, productores y consumidores en general, lo cual ayuda a contribuir a velar por la inocuidad de la leche, cumpliendo con los requisitos para obtener derivados lácteos aptos para el consumo humano. Los objetivos de la investigación fueron: 1) Determinar el tiempo de eliminación del peróxido de hidrógeno en leche cruda, con y sin conservante, en 5 concentraciones, usando el método colorímetro con tiras de ensayo, a 0, 1, 2, 3 o más horas, y 2) conocer la influencia del peróxido de hidrógeno en las características físico-químicas y microbiológicas de la leche cruda.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de Leche de AGROCALIDAD, ubicado en la parroquia de Tumbaco, cantón Quito.

**Población objeto de estudio.-** La leche analizada fue obtenida de 26 vacas de raza Holstein (sometidas a igual manejo y alimentación, con una producción de 900 litros/día) directamente del bidón de recolección de la leche inmediatamente ordeñada, en el Campo Académico Docente Experimental la Tola (CADET) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, las cuales representan el hato completo de la explotación

**Unidades de muestreo.-** Se obtuvieron 12 muestras por día; por un lado, se dispuso de cinco

concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.5 mg/l, 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l y 25 mg/l) y un testigo con conservante Bronopol (tubos de plástico de 10 ml con una pastilla de bronopol, Broad Spectrum Microtabs II, D&F Control Systems Inc. USA), y por otro muestras con las mismas concentraciones de peróxido de hidrógeno más el testigo, pero sin el conservante. La Tabla 1 presenta los detalles de las muestras.

**Tabla 1:** Unidades de muestreo

Muestra	Concentración	Con conservante
Muestra 1	Testigo (0)	Cc
Muestra 2	0.5 mg/l	Cc
Muestra 3	2 mg/l	Cc
Muestra 4	5 mg/l	Cc
Muestra 5	10 mg/l	Cc
Muestra 6	25 mg/l	Cc
Muestra 7	Testigo (0)	Sc
Muestra 8	0.5 mg/l	Sc
Muestra 9	2 mg/l	Sc
Muestra 10	5 mg/l	Sc
Muestra 11	10 mg/l	Sc
Muestra 12	25 mg/l	Sc

Se realizó cinco serios semanales, lo que da un total de 60 muestras.

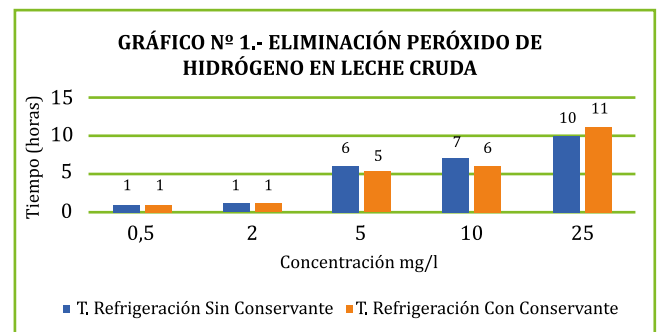
**Unidad experimental.**- La unidad experimental estuvo constituida por una muestra de leche de 40 ml. Las muestras se obtuvieron mediante un Diseño Aleatorio Simple, directamente de los bidones de recolección; fueron recolectadas en envases estériles, previa homogenización.

**Procesamiento de las muestras.**- Las muestras fueron procesadas en el laboratorio, donde se procedió a colocar la leche en frascos estériles tanto con conservante (Bronopol), como sin conservante. Seguidamente se simuló una adulteración de la leche con las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.5 mg/l, 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l y 25 mg/l), para las muestras con y sin conservante. Una vez realizada la adulteración se procedió a tomar mediciones cada hora para determinar la estabilidad de peróxido de hidrógeno en la leche cruda. Posterior a esto se realizó el análisis físico-químico y microbiológico, para determinar si existe alteración en las características (acidez, crioscopía, conteo bacteriano, pH, sólidos totales, sólidos no grasos, proteína y grasa) de la leche (de acuerdo a las recomendaciones de la Normas INEN y otros procedimientos [5-15]). Los datos obtenidos del

tiempo de eliminación y concentraciones del peróxido de hidrógeno, se reportaron en gráficos con diagrama de barras, donde las categorías corresponden a las diferentes concentraciones (testigo, 0,5, 2, 5, 10 y 25 mg/l) y la variable tiempo (0, 1, 2, 3 horas y más), considerando las condiciones con y sin conservante. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante análisis de varianza (ADEVA), y Prueba de Tukey al 5% de significancia como prueba de comparación estadística de las medias.

### III. RESULTADOS

En este estudio se observa el tiempo de eliminación del peróxido de hidrógeno en leche cruda, con y sin conservante, a las diferentes concentraciones, cuyos resultados se detallan en la Fig. 1. Se observa que, para la concentración 0.5 mg/l y 2 mg/l, con y sin conservante, la estabilidad del peróxido de hidrógeno en la leche fue de una hora. Como era de esperar, el aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno tuvo como implicación un aumento en el tiempo de eliminación. Con 5 mg/l y sin conservante, la estabilidad del peróxido de hidrógeno fue de 6 horas, mientras que la condición con conservante fue de 5 horas. Con 10 mg/l y sin conservante la estabilidad fue de 7 horas, mientras que la condición con conservante fue de 6 horas. Para 25 mg/l y sin conservante la estabilidad del peróxido de hidrógeno fue de 10 horas, mientras que la condición con conservante fue de 11 horas.



**Fig. 1:** Tiempo de eliminación del peróxido de hidrógeno

Respecto al análisis de las características físico-químicas y microbiológicas de leche cruda, los resultados experimentales, que se detallan en la Tabla 2, fueron sometidos a un análisis de varianza (ADEVA), encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las variables acidez y número de bacterias (cuyos valores se redujeron), y crioscopía

(cuyos valores aumentaron); determinando que la aplicación de peróxido de hidrógeno si produce efecto en estas variables, frente a la condición de con y sin conservante. De acuerdo a la investigación realizada por Arias y colaboradores (2010), [2] la reducción de bacterias en la leche no es aconsejable pues perjudica a los microorganismos beneficiosos que participan en el proceso de elaboración de derivados lácteos.

Para las variables pH, sólidos totales, sólidos no grasos, proteína y grasa, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Este resultado demuestra que el efecto del peróxido de hidrógeno en la leche cruda no influye sobre estas características de la leche frente a la condición con y sin conservante. Estos datos coinciden con la investigación realizada por Arias y colaboradores (2010) en Venezuela [2].

**Tabla 2:** Análisis de varianza.

Dato	Fuente de variación	Medias	Valor p (Pr(>F))
Acidez	Sin conservante	8,57e - 05	0,1727
	Conservante	3,75e - 04	0,0104 *
Crioscopía	Sin conservante	0,0000049	0,994
	Conservante	0,0013633	1,05e-05 ***
Bacterias	Sin conservante	109,31	0,0403 *
	Conservante	1,07	0,8759
pH	Sin conservante	0,0007480	0,877
	Conservante	0,0006667	0,576
Sólidos totales	Sin conservante	0,03350	0,713
	Conservante	0,01094	0,664
Sólidos no grasos	Sin conservante	0,02474	0,620
	Conservante	0,00308	0,768
Proteína	Sin conservante	0,003995	0,980
	Conservante	0,010935	0,529
Grasa	Sin conservante	0,003894	0,932
	Conservante	0,001042	0,792

\*Diferencia significativa

Pese a que el Codex Alimentario emitió “directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del sistema de la lactoperoxidasa”, [16] el uso de peróxido de hidrógeno está prohibido en el Ecuador de acuerdo a la NTE INEN 9, [2], debido a que su uso indiscriminado puede enmascarar la acidez elevada producto de contaminación bacteriana y de una inadecuada refrigeración.

En un estudio realizado por Souza et al. [17] en leche larga vida en Brasil, se observó la presencia de peróxido de hidrógeno en el 30% de las muestras. Como interpretación, los autores de

dicho estudio consideraron que este tipo de alteración es muy practicada principalmente por los productores rurales, quizás debido a la insuficiente disponibilidad de electricidad para poder mantener bajo refrigeración el producto. De forma similar, en la investigación realizado por Arias et al. (2010) [2] en Venezuela, se observó excesos en la concentración de peróxido de hidrógeno respecto de lo permitido en aquel país.

En una investigación realizada en Sudan, [18] se determinó que la adición de peróxido de hidrógeno, dependiendo de su concentración, pueden alterar parámetros importantes en la leche. Llamativo es el caso de la variación de la acidez de la leche que se reporta en ese estudio. Tomando en cuenta que el peróxido de hidrógeno es eliminado en un periodo de tiempo de algunas horas (dependiendo de la concentración), variaciones de ciertos parámetros (incluyendo el conteo bacteriano) podrían ser tomados en cuenta como indicios de este tipo de adulteración. Futuros trabajos podrían abordar esta temática.

## V. CONCLUSIONES

En el presente estudio se determinó que el peróxido de hidrógeno en leche cruda, con y sin conservante, es eliminado en un tiempo determinado, posiblemente por evaporación. Por esta razón, el método de análisis por las tiras colorimétricas podría generar falsos negativos. Se observó que la adición de peróxido de hidrógeno reduce significativamente el conteo bacteriano, pero no ejerce diferencias significativas sobre otras características físico-químicas de la leche cruda.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Control y Calidad de Leche de AGROCALIDAD

## REFERENCIAS

- [1] L. Torres (2009) “Estudio de prefactibilidad para la implantación de la producción y comercialización de leche cruda en la finca la Floresta”, Tesis pregrado, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- [2] Y. Arias, E. Salas, R. Romero (2010) “Efecto del peróxido de hidrógeno en la calidad físico química de la leche cruda de vaca”, Rev. Unell. Cienc. Tec.

Volumen Especial, 52-57.

[3] Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN (2012) Norma Técnica Ecuatoriana Nro. 9: Leche cruda – requisitos, quinta revisión, Quito, Ecuador.

[4] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2013) Resolución DAJ-20134661-0210,0213: Manual de procedimientos para la vigilancia y control de la inocuidad de la leche cruda, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[5] Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN (2012) Norma Técnica Ecuatoriana Nro. 12: Leche - Determinación del contenido de grasa, Quito, Ecuador.

[6] Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN (2012) Norma Técnica Ecuatoriana Nro. 11: Leche - Determinación de la densidad relativa, primera revisión, Quito, Ecuador.

[7] Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN (2012) Norma Técnica Ecuatoriana Nro. 15: Leche - Determinación del punto de congelación, Quito, Ecuador.

[8] Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN (2012) Norma Técnica Ecuatoriana Nro. 13: Leche - Determinación de la acidez titulable, primera revisión, Quito, Ecuador.

[9] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2014) Procedimientos Específicos de Ensayo: PEE/CL/002 - Determinación de la composición de la leche cruda, segunda revisión, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[10] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2014) Procedimientos Específicos de Ensayo: PEE/CL/018 - Determinación del punto de congelación de la leche cruda, primera revisión, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[11] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2014) Procedimientos Específicos de Ensayo: PEE/CL/003 - Determinación del conteo total bacteriano de la leche cruda, segunda revisión, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[12] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2014) Procedimientos Específicos de Ensayo: PEE/CL/008 - Determinación de peróxidos de la leche cruda, segunda revisión, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[13] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2014) Procedimientos Específicos de Ensayo: PEE/CL/007. (2014) - Determinación de la acidez mediante

potenciómetro de la leche cruda, segunda revisión, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[14] Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD (2014) Procedimientos Específicos de Ensayo: PEE/CL/012 - Determinación de la acidez titulable de la leche cruda, segunda revisión, AGROCALIDAD, Quito, Ecuador.

[15] J. Mungula. Manual de procedimientos para análisis de calidad de leche. [Citado Abril de 2015]. Disponible online en: <http://www.cuentadelmilenio.org.ni/cedoc/02negrural/02%20Conglomerado%20Pecuario/05%20Manuales/20%20Manual%20de%20Procedimientos%20para%20Análisis%20de%20calidad%20de%20la%20Leche.pdf>

[16] Instituto Nacional de Nutrición. Venezuela. Sistema Lactoperoxidasa como método alternativo para la Conservación de la Leche. [Citado Septiembre 2014]. Disponible online en: <http://www.inn.gov.ve/innw/?p=4893>

[17] S. S. Souza, A. G. Cruz, E. H. M. Walter, J. A. F. Faria, R. M. S. Celeghini, M. M. C. Ferreira, D. Granato, A. de Sant'Ana (2011) "Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach", Food Chem. 124(2), 692-695.

[18] S. H. Elamin (2005) "The use of Hydrogen Peroxide for preservation of raw milk", Tesis de M.Sc., Departament of Food Science and Technology, University of Khartoum, Khartoum, Sudan.