

SEGUNDA SECCION
SECRETARIA DE SALUD

NORMA Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-184-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA Y PRODUCTO LACTEO COMBINADO. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o. fracciones XXII y XXIV, 13 apartado A) fracciones I y II, 194 fracción I, 197, 199, 201, 210, 214 y demás aplicables de la Ley General de Salud; 38 fracción II, 40 fracciones I, II, V, XI, XII, 41, 43 y 47 fracción IV, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización;

4o., 8o., 14, 15, 25, quinto transitorio y demás aplicables del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2, literal C fracción II, 34 y 36 fracción V, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y 2 fracciones II y III, 7 fracción XVI, y 11 fracciones I y II del Decreto por el que se crea la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, me permito ordenar la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** de la siguiente Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.

CONSIDERANDO

Que con fecha 11 de marzo de 1999, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, ahora Dirección General de Control Sanitario de Productos y Servicios, presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 16 de junio de 2000, en cumplimiento del Acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentarán sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-184-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE,
FORMULA LACTEA Y PRODUCTO LACTEO COMBINADO. ESPECIFICACIONES SANITARIAS**

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

Dirección General de Control Sanitario de Productos y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION (SAGARPA)

Dirección General de Ganadería

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION
ASOCIACION DE GANADEROS PRODUCTORES DE LECHE PURA, S.A.
GRUPO INDUSTRIAL LALA
COMPAÑÍA NACIONAL DE SUBSISTENCIAS POPULARES
LICONSA, S.A. DE C.V.
NEOLAC, S.A. DE C.V.
PARMALAT DE MEXICO, S.A. DE C.V.
PASTEURIZADORA AGUASCALIENTES, S.A. DE C.V.
TETRA PAK, S.A. DE C.V.
EVAPORADORA MEXICANA, S.A. DE C.V.
CONSEJO NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE PASTEURIZACION LACTEA
CAMARA NACIONAL DE INDUSTRIALES DE LA LECHE

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Clasificación
6. Especificaciones sanitarias
7. Especificaciones nutrimentales
8. Muestreo
9. Métodos de prueba
10. Etiquetado
11. Envase y embalaje
12. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
13. Bibliografía
14. Observancia de la norma
15. Vigencia
 - Apéndice normativo
 - Apéndice informativo

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias que debe cumplir la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

2. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

- | | | |
|------|-------------------|--|
| 2.1 | NOM-033-SSA1-1993 | Bienes y servicios. Irradiación de alimentos. Dosis permitidas en alimentos, materias primas y aditivos alimentarios. |
| 2.2 | NOM-086-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. |
| 2.3 | NOM-088-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Contaminación por Radionúclidos en Alimentos de consumo masivo importados. Límites máximos permisibles. |
| 2.4 | NOM-092-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. |
| 2.5 | NOM-110-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. |
| 2.6 | NOM-112-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. |
| 2.7 | NOM-113-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. |
| 2.8 | NOM-114-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método para la determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos. |
| 2.9 | NOM-115-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| 2.10 | NOM-116-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Determinación de la humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. |
| 2.11 | NOM-117-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc, y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica. |
| 2.12 | NOM-120-SSA1-1994 | Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. |
| 2.13 | NOM-127-SSA1-1994 | Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. |
| 2.14 | NOM-130-SSA1-1995 | Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. |
| 2.15 | NOM-131-SSA1-1995 | Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. |
| 2.16 | NOM-143-SSA1-1995 | Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> . |
| 2.17 | NOM-145-SSA1-1995 | Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Especificaciones sanitarias. |

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Aditivos para alimentos, a las sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación, entre otras funciones.

3.2 Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, a los productos que se les han introducido cambios por adición, disminución o eliminación de uno o más de sus nutrimentos, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales y que forman parte de la dieta habitual.

3.3 Bitácora o registro, al documento controlado que provee evidencia objetiva y auditable de las actividades ejecutadas o resultados obtenidos durante el proceso del producto y su análisis.

3.4 Buenas prácticas de fabricación, al conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones sanitarias requeridas para su uso o consumo. En particular en el caso de los aditivos se refiere a la cantidad mínima indispensable para lograr el efecto deseado.

3.5 Consumidor, a la persona física o moral que adquiere o disfruta como destinatario final productos alimenticios y bebidas no alcohólicas preenvasados. No es consumidor quien adquiera, almacene o utilice alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados, con objeto de integrarlos en procesos de producción, transformación, comercialización o prestación de servicios a terceros.

3.6 Deshidratación, al tratamiento que consiste en la eliminación de agua de un producto.

3.7 Embalaje, al material que envuelve, contiene o protege debidamente a los envases primarios, secundarios, múltiples y colectivos que facilite y resiste las operaciones de almacenamiento y transporte, no destinado para su venta al consumidor en dicha presentación.

3.8 Envasado aséptico, al proceso que reúne las condiciones de esterilidad comercial para evitar la presencia de microorganismos en el producto durante el envasado.

3.9 Envase colectivo, al recipiente o envoltura en el que se encuentran contenidos dos o más variedades diferentes de productos preenvasados, destinados para su venta al consumidor en dicha presentación.

3.10 Envase múltiple, al recipiente o envoltura en el que se encuentran contenidos dos o más variedades iguales de productos preenvasados, destinados para su venta al consumidor en dicha presentación.

3.11 Envase primario, al recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo.

3.12 Esterilización comercial, al tratamiento térmico aplicado al producto para la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la salud pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración.

3.13 Etiqueta, al marbete, rótulo, inscripción, marca, imagen gráfica u otra forma descriptiva que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado, en relieve o en hueco, grabado, adherido, precintado o anexo al empaque o envase del producto.

3.14 Fecha de caducidad, a la fecha límite en que se considera que un producto preenvasado almacenado en las condiciones establecidas por el fabricante, mantiene las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.

3.15 Fórmula láctea, al producto definido de conformidad con la norma de denominación correspondiente.

3.16 Higiene, a las medidas necesarias para garantizar la sanidad e inocuidad de los productos en todas las fases del proceso hasta su consumo final.

3.17 Inocuo, a lo que no hace o causa daño a la salud.

3.18 Leche, al producto destinado para consumo humano, proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de especies domésticas.

3.19 Límite máximo, a la cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides entre otros que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

3.20 Limpieza, a la eliminación de materiales indeseables (tierra, residuos, suciedad, polvo, entre otros).

3.21 Lote, a la cantidad de un producto elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas.

3.22 Materia extraña, a la sustancia, resto o desecho orgánico o no, que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo no higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: excretas, pelos de cualquier especie, huesos e insectos que resultan perjudiciales para la salud.

3.23 Metal pesado y metaloide, a los elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo.

3.24 Métodos de prueba, al procedimiento técnico utilizado para la determinación de parámetros o características de un producto, proceso o servicio.

3.25 Muestra, al total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.

3.26 Pasteurización, al tratamiento térmico al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos.

3.27 Planta procesadora, al establecimiento dedicado al proceso de pasteurización, ultrapasteurización, esterilización, deshidratación, rehidratación, entre otros procesos de la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.

3.28 Proceso, al conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

3.29 Producto a granel, al producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor por no encontrarse preenvasado al momento de su venta.

3.30 Producto lácteo combinado, al producto definido de conformidad con la norma de denominación correspondiente.

3.31 Prueba de esterilidad comercial, a la retención temporal de las muestras representativas de los productos bajo condiciones de tiempo y temperatura establecidas para verificar la esterilidad comercial del producto.

3.32 Rehidratación, al procedimiento mediante el cual se restituye el agua a los productos deshidratados objeto de esta Norma.

3.33 Refrigeración, al método de conservación físico que se emplea en los alimentos para inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, reducir las reacciones bioquímicas y el deterioro propio de los alimentos.

3.34 Ultrapasteurización, al tratamiento térmico, al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo, que garantice la esterilidad comercial y que sea envasado asépticamente.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

AFM ₁	aflatoxina M ₁
BPF	buenas prácticas de fabricación
conc.	concentración
cm	centímetro
CI	color index
HPLC	cromatografía de líquidos de alta eficacia
°C	grados Celsius
°K	grados Kelvin
g	gramo
x g	gravedad (en centrifugado)
h	hora
=	igual

IDR	Ingesta Diaria Recomendada
kcal	kilocaloría
kg	kilogramo
kJ	kilojoules
lb	libra
L	litro
+	más
m	masa
±	más-menos
Máx.	máximo
	mayor o igual que
>	mayor que
	menor o igual que
<	menor que
μ	micra
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micrómetro
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minutos
M	molar
m/v	masa a volumen
ng	nanogramo
nm	nanómetro
N	normal
No.	número
/	por
%	por ciento
pH	potencial de hidrógeno
pulg	pulgada
rpm	revoluciones por minuto
X	signo de multiplicación
UV	ultravioleta
UF	unidades de fenol
UFC	unidades formadoras de colonias
UI	unidades internacionales
V	volumen
v/v	volumen a volumen

Cuando en la presente Norma se mencione:

- Acuerdo, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes, y sus modificaciones.
- CICOPLAFEST, debe entenderse que se trata de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

5. Clasificación

Los productos objeto de esta Norma por el tratamiento al que han sido sometidos se clasifican en:

5.1 Pasteurizados

5.2 Ultrapasteurizados

5.3 Esterilizados

5.4 Deshidratados

6. Especificaciones sanitarias

Los productos objeto de esta Norma, deben ajustarse a las siguientes especificaciones:

6.1 El proveedor de las materias primas y los establecimientos donde se procesen o comercialicen los productos objeto de esta Norma, cada uno en el ámbito de su responsabilidad deben observar que las sustancias empleadas para la eliminación de plagas en cualquier parte del proceso cumplan con las especificaciones establecidas en el Catálogo Oficial de Plaguicidas vigente del CICOPLAFEST.

6.2 La leche que se emplee como materia prima debe cumplir con lo siguiente:

6.2.1 No presentar materias extrañas, conservadores ni sustancias neutralizantes.

6.2.2 No coagular por ebullición.

6.2.3 Presentar prueba de alcohol al 68% negativa.

6.2.4 Presentar prueba de inhibidores bacterianos, negativa; detectados por métodos fisicoquímicos y microbiológicos, de conformidad con la tabla 2 del presente ordenamiento.

6.3 Los ingredientes que se utilicen en la elaboración de la fórmula láctea o producto lácteo combinado, deben cumplir con lo establecido en el Reglamento y las normas correspondientes.

6.4 Los productos objeto de esta Norma y sus ingredientes, que hayan sido sometidos al proceso de irradiación deben cumplir con lo establecido en la NOM-033-SSA1-1993, señalada en el apartado de referencias.

6.5 La leche deshidratada y los ingredientes importados, que se empleen para la elaboración de los productos objeto de esta Norma, deben cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-088-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias.

6.6 En su elaboración, se debe emplear agua potable según corresponda de conformidad con lo señalado en la NOM-127-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias.

6.7 Los establecimientos dedicados a la elaboración de los productos objeto de esta Norma, deben cumplir con lo establecido en la NOM-120-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

Para efectos de la limpieza del equipo, se recomienda el uso de sustancias desinfectantes, cuya lista figura en el apéndice informativo B de este ordenamiento.

6.8 La leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, deben someterse a pasteurización, ultrapasteurización, esterilización o deshidratación, conforme a lo siguiente:

6.8.1 Los productos que se sometan a pasteurización deben cumplir con lo siguiente:

6.8.1.1 Pasteurización lenta. Los productos se someterán a una temperatura de 63°C, por un periodo mínimo de 30 min u otra relación de tiempo y temperatura equivalente.

6.8.1.1.1 El equipo debe contar, por lo menos, con un sistema para registro y control de la temperatura y tiempo del proceso, tina con tapa y sistema de agitación del producto, termómetro de mercurio o su equivalente.

6.8.1.2 Pasteurización rápida. Los productos se someterán a una temperatura de 72°C, por un periodo mínimo de 15 segundos, u otra relación de tiempo y temperatura equivalente.

6.8.1.2.1 El equipo debe ser diseñado, instalado y operado de forma que se alcancen los tiempos y temperaturas establecidos y debe contar, por lo menos, con lo siguiente:

6.8.1.2.1.1 Sistema de control y registro automático de la temperatura y tiempo del proceso que no permita el paso del producto cuando no se haya alcanzado la temperatura mínima establecida en el presente ordenamiento.

6.8.1.2.1.2 Termómetro de mercurio o su equivalente en buen estado de funcionamiento y calibrado, colocado al final de la "zona de sostenimiento" del equipo. La temperatura registrada en el sistema de control y registro del proceso debe ser igual o menor hasta 1,0°C a la temperatura que indique dicho termómetro.

6.8.1.2.1.3 El equipo debe instalarse y mantenerse de forma que no se produzca en ningún momento del proceso, contaminación de leche pasteurizada con leche cruda o agua de proceso.

6.8.1.2.2 Al término de la pasteurización y hasta el momento del envasado el producto no debe exceder los 6 °C (280 K).

6.8.2 Los productos que se sometan a ultrapasteurización deben cumplir con lo siguiente:

6.8.2.1 Someterse a una temperatura de 135°-149°C por 2 a 8 segundos, que sean equivalentes a la permanencia de tiempo y temperatura que se muestra en la siguiente gráfica:

6.8.2.2 El equipo para el sistema de tratamiento térmico debe contar con dispositivos de control y registro de temperatura de operación durante el tiempo de producción, que permita comprobar que los productos han sido sometidos al tratamiento térmico establecido.

6.8.2.3 El envase debe someterse a un tratamiento de esterilización.

6.8.2.3.1 Los agentes esterilizantes deben cumplir con las siguientes características:

6.8.2.3.1.1 Tener actividad esporicida.

6.8.2.3.1.2 No debe degradar el material del envase.

6.8.2.3.1.3 Se debe evaporar fácilmente de la superficie del envase.

6.8.2.3.1.4 No debe reaccionar con el producto.

6.8.2.3.1.5 En caso de utilizar peróxido de hidrógeno, éste debe cumplir con lo siguiente:

6.8.2.3.1.5.1 Sólo se permite su empleo para efectos de desinfección de los envases.

6.8.2.3.1.5.2 Emplearse en una concentración de 30 al 50%.

6.8.2.4 El producto debe ser envasado asépticamente en envases que cuenten con barreras para proteger el producto del oxígeno y la luz, llenarse en ausencia de aire. El cierre de los envases debe ser hermético y llevar a cabo las pruebas para su control y los registros correspondientes.

6.8.2.5 Los establecimientos deben destinar un área de incubación para la prueba de esterilidad comercial para efectos del control interno de una muestra representativa de la producción, de la cual se debe tomar una submuestra para someterse a análisis microbiológicos.

6.8.2.6 Los productos sometidos a relaciones de tiempo y temperatura superiores a las establecidas en el apartado 6.6.1 y con envasado no aséptico deben cumplir, por lo menos, con las disposiciones y especificaciones sanitarias establecidas para los productos que se sometan a pasteurización.

6.8.3 Los productos esterilizados además de cumplir con lo establecido en la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias, deben cumplir con lo establecido en el apartado de especificaciones de este ordenamiento, según corresponda.

6.8.4 Los productos sometidos a deshidratación deben cumplir con lo siguiente:

6.8.4.1 Los que se utilicen como materia prima deben ser pasteurizados previamente a la deshidratación.

6.8.4.2 Los productos deshidratados objeto de esta Norma, no se podrán vender a granel al consumidor.

6.9 Los productos objeto de esta Norma deshidratados o en polvo y sometidos a rehidratación deben ser pasteurizados, ultrapasteurizados o esterilizados, conforme a este ordenamiento.

6.10 Control documental del proceso:

6.10.1 El proceso de los productos objeto de esta Norma debe documentarse en bitácoras o registros, de manera que garantice los requisitos establecidos (Tabla 1). El diseño de los formatos y la frecuencia de los registros quedan bajo responsabilidad del fabricante y deben:

6.10.1.1 Contar con respaldos que aseguren la veracidad de la información y un procedimiento para la prevención de acceso y correcciones no controladas.

6.10.1.2 Conservarse por lo menos un mes más del periodo establecido de vida de anaquel del producto y estar a disposición de la autoridad sanitaria cuando así lo requiera.

6.10.1.3 Contar con fecha y alguna forma de identificación del encargado de elaborar los registros.

Tabla 1. Información mínima de las bitácoras o registros de las diferentes etapas del proceso y de las buenas prácticas de fabricación

REGISTRO DE:	INFORMACION
Materias primas.	<ul style="list-style-type: none"> - Listado de materia prima, lote u origen que garantice su rastreabilidad. - Temperaturas de conservación de las materias primas que requieren refrigeración o congelación. - Resultados de su análisis en el que se incluya como mínimo: <ul style="list-style-type: none"> • Nombre de la materia prima. • Lote. • Parámetro sanitario analizado. • Laboratorio responsable. - O certificado de calidad sanitaria que avale su inocuidad. - O resultados de análisis efectuados por el proveedor de la materia prima.

Producto terminado.	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura de conservación; conforme al producto terminado del que se trate, en planta y distribución. - Análisis del producto terminado en el que se incluya como mínimo: <ul style="list-style-type: none"> • Nombre del producto. • Lote. • Parámetro sanitario analizado, conforme a lo señalado en los apartados 6.14 y 6.15 de esta Norma. • Laboratorio.
Control o erradicación de fauna nociva.	<ul style="list-style-type: none"> a) Por contratación: <ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Comprobante de fumigación proporcionado por la empresa responsable. - Sustancias usadas. - Número de licencia de la empresa que aplica, expedida por la autoridad correspondiente. b) Autoaplicación: <ul style="list-style-type: none"> - Aprobación del responsable técnico, expedida por la autoridad correspondiente. - Sustancias usadas. - Concentraciones.
Estado de salud del personal del área de producción.	<ul style="list-style-type: none"> - Tipo de análisis. - Resultados. - Laboratorio.
Lavado de envase retornable.	<ul style="list-style-type: none"> - Procedimiento escrito de lavado y desinfección y registro de su cumplimiento.
Limpieza y desinfección del equipo, utensilios e instalaciones del área de proceso.	<ul style="list-style-type: none"> - Productos usados. - Concentraciones. - Tiempos de contacto. - Enjuagues. - O procedimiento por escrito que garantice la limpieza, desinfección y registro de su cumplimiento.
Mantenimiento del equipo.	<ul style="list-style-type: none"> - Tipo de mantenimiento (preventivo o correctivo). - Operación realizada. - Calibración de los instrumentos de control del tratamiento térmico a que somete el producto. - Fecha.
Proceso.	<ul style="list-style-type: none"> - Contar con diagramas de bloque del proceso de elaboración, que indique los puntos críticos del proceso, mismo que estará a disposición de la autoridad sanitaria cuando así lo requiera. - Control del tratamiento térmico. <ul style="list-style-type: none"> • Registro o gráficas de temperaturas.

6.11 Transporte, almacenamiento y venta.

6.11.1 Para el transporte, almacenamiento y venta de los productos sometidos a pasteurización, se debe cumplir con lo siguiente:

6.11.1.1 No se debe colocar hielo o mantas húmedas directamente sobre las canastillas o los envases para su conservación.

6.11.1.2 Mantener el producto a las siguientes temperaturas de refrigeración:

6.11.1.2.1 Planta: áreas de almacén y transporte a una temperatura máxima de 7°C.

6.11.1.2.2 Distribución y expendio: En las áreas de almacenamiento y punto de venta se debe mantener el producto a una temperatura máxima de 9°C, de lo cual se deben mantener registros durante un mes a partir de la fecha de recepción del producto, que contenga como mínimo temperatura diaria registrada, fecha, hora, nombre y firma del encargado de realizar el registro. El diseño de los formatos quedan bajo la responsabilidad de los mismos y deben estar a disposición de la autoridad sanitaria, cuando así lo requiera.

6.11.2 Los productos sometidos a ultrapasteurización o esterilización, durante su almacenamiento, transporte o distribución, deben conservarse en un lugar fresco y seco. No es necesario refrigerarlos mientras el envase del producto permanezca cerrado.

6.12 Se debe llevar un programa de control del estado de salud del personal que participe directamente en la elaboración del producto, en el que se incluya de acuerdo a la valoración médica la

realización de análisis clínicos, tales como exudado faríngeo, análisis coproparasitológicos y reacciones febriles.

De acuerdo al tratamiento empleado, los productos objeto de este ordenamiento deben cumplir con las siguientes especificaciones:

6.13 Fisicoquímicas e inhibidores.

Tabla 2

PRODUCTO	LIMITE MAXIMO							
	FISICAS Y QUIMICAS			INHIBIDORES				
				Fisicoquímicos				Microbiológicos
	Prueba de fosfatasa residual UF/ml	Materia extraña	Humedad %	Derivados Clorados	Sales cuaternarias de amonio	Oxidantes	Formaldehído	Pruebas Microbiológicas
Pasteurizados	4	Ausencia	N.A.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ultrapasteurizados	N.A.	Ausencia	N.A.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Esterilizados	N.A.	Ausencia	N.A.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Deshidratados	N.A.	Ausencia	4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

N.A. = No aplica

6.14 Contaminantes.

Tabla 3

PRODUCTO	LIMITE MAXIMO			
	METALES PESADOS O METALOIDES			AFLATOXINA M ₁
	Arsénico (As) mg/kg	Mercurio (Hg) mg/kg	Plomo (Pb) mg/kg	g/L
Pasteurizados	0,2	0,05	0,1	0,5
Ultrapasteurizados	0,2	0,05	0,1	0,5
Esterilizados	0,2	0,05	0,1	0,5
Deshidratados	0,2	0,05	0,1	0,5

6.15 Microbiológicas.

6.15.1 Productos sometidos a pasteurización.

Tabla 4

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Organismos coliformes totales en planta	< 10 UFC/mL
Organismos coliformes totales en punto de venta	< 20 UFC/mL
<i>Salmonella spp.</i> *	Ausente en 25 mL
<i>Staphylococcus aureus</i> *	< 10 UFC/mL en siembra directa
<i>Listeria monocytogenes</i> *	Ausente en 25 mL

* Se determinará únicamente bajo situaciones de emergencia sanitaria, cuando la Secretaría de Salud de acuerdo al muestreo y los resultados de los análisis microbiológicos detecte la presencia de dichos microorganismos, asimismo ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de los mismos.

6.15.2 Productos sometidos a ultrapasteurización.

Tabla 5

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	Negativo
Mesofílicos anaerobios	Negativo
Termofílicos aerobios	Negativo
Termofílicos anaerobios	Negativo

6.15.3 Productos sometidos a deshidratación.

Tabla 6

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Coliformes totales	< 10 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25 g
<i>Escherichia coli</i> ¹	< 3 NMP/g
Enterotoxina estafilocócica	Negativa

¹ Véase apéndice normativo B

6.16 Aditivos.

6.16.1 Únicamente se permiten los siguientes aditivos en los límites y productos que se señalan a continuación.

Tabla 7

Aditivo	Límite máximo	Observaciones
Acido algínico	BPF	Productos saborizados
Acido ascórbico *	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos deshidratados
	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos con grasa vegetal
Agar	BPF	Productos saborizados
Alginato de amonio	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Alginato de calcio	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Alginato de potasio	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Alginato de propilenglicol	1400 mg/kg	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1400 mg/kg	Productos saborizados
Alginato de sodio	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Ascorbato de calcio *	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos deshidratados
	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos con grasa vegetal
Ascorbato de potasio*	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos deshidratados
	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos con grasa vegetal
Ascorbato de sodio *	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos deshidratados
	0,5 g/kg expresado como ácido ascórbico	Productos con grasa vegetal
Carbonato de amonio	BPF	Productos saborizados
Carbonato de calcio	10 g/kg solo o combinado	Productos deshidratados
Carbonato hidrogenado de amonio	BPF	Productos saborizados
Carbonato hidrogenado de potasio	BPF	Productos saborizados
Carbonato hidrogenado de sodio	BPF	Productos saborizados
Carbonato de magnesio	BPF	Productos saborizados

* No debe reportarse como nutrimento

Carbonato de potasio	BPF	Productos saborizados
Carbonato de sodio	BPF	Productos saborizados
Carboximetilcelulosa	BPF	Productos saborizados
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos modificados en su composición
Carboximetilcelulosa sódica	BPF	Productos saborizados
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos modificados en su composición
Carragenato de amonio	1,2g/kg solo o combinado	Productos esterilizados
	1,2g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2g/kg solo o combinado	Productos saborizados
Carragenato de calcio	1,2g/kg solo o combinado	Productos esterilizados
	1,2g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2g/kg solo o combinado	Productos saborizados
Carragenato de potasio	1,2g/kg solo o combinado	Productos esterilizados
	1,2g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2g/kg solo o combinado	Productos saborizados
Carragenato de sodio	1,2g/kg solo o combinado	Productos esterilizados
	1,2g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2g/kg solo o combinado	Productos saborizados
Carragenina	0,15 g/kg solo o combinado	Productos esterilizados
	1,2g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Citrato de calcio	2g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Citrato de potasio	2 g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	5g/kg, solo o combinado, expresado como sustancia anhidra.	Productos deshidratados
	2g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Citrato de sodio	2 g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	5g/kg, solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
	2g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Citrato tripotásico	5g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
Citrato trisódico	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
Cloruro de calcio	1,2 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Cloruro de potasio	2g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	BPF	Productos deshidratados
Cloruro de sodio	2g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados

	BPF	Productos deshidratados
Dióxido de silicón amorfo	10 g/kg solo o combinado	Productos deshidratados
Esteres acéticos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Productos modificados en su composición
Esteres cítricos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Productos modificados en su composición
Esteres de ácido diacetil tartárico	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Productos modificados en su composición
Esteres de glicerol de ácidos grasos y ácido láctico	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Esteres de glicerol de ácidos grasos y ácido diacetil tartárico	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Productos modificados en su composición
Esteres de glicerol de ácidos grasos, tartárico y acético (mezclados)	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Productos modificados en su composición
Esteres de sacarosa y ácidos grasos	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Esteres diacetil tartáricos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Esteres tartáricos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Fosfato dihidrogenado de calcio	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
Fosfato dihidrogenado de potasio	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	0,15 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Leche Ultrapasteurizada
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
	BPF	Productos saborizados
	0,5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos modificados en su composición
	1,2 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Fosfato dihidrogenado de sodio	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	0,15 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Leche ultrapasteurizada
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
	BPF	Productos saborizados
	0,5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos modificados en su composición
	1,2 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Fosfato hidrogenado de calcio	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
Fosfato hidrogenado dipotásico	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	0,15 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Leche ultrapasteurizada
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
	BPF	Productos saborizados

	0,5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos modificados en su composición
	1,2 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Fosfato hidrogenado disódico	2g/kg solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	0,15 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Leche ultrapasteurizada
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
	BPF	Productos saborizados
	0,5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos modificados en su composición
	1,2 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Fosfato tripotásico	2 g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
Fosfato trisódico	2 g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
Gelatina	BPF	Productos saborizados
Goma de algarrobo	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma arábica	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma damar	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma gellana	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma guar	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma karaya	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma tara	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma tragacanto	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Goma xantana	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
Hidróxido de amonio	BPF	Productos saborizados
Hidróxido de magnesio	BPF	Productos saborizados
Hidróxido de potasio	BPF	Productos saborizados
Hidróxido de sodio	BPF	Productos saborizados
Hidroxipropil metil celulosa	BPF	Productos saborizados
Lecitina	BPF	Productos esterilizados

	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	BPF	Productos saborizados
	BPF	Productos deshidratados
Monoestearato de sorbitán polioxietileno (20)	0,5 g/kg	Productos saborizados
Palmitato de amonio	0,1 g/kg	Productos deshidratados
	0,1 g/kg	Productos con grasa vegetal
Palmitato de ascorbilo	0,1 g/kg	Productos deshidratados
	0,1 g/kg	Productos con grasa vegetal
Palmitato de calcio	0,1 g/kg	Productos deshidratados
	0,1 g/kg	Productos con grasa vegetal
Palmitato de potasio	0,1 g/kg	Productos deshidratados
	0,1 g/kg	Productos con grasa vegetal
Palmitato de sodio	0,1 g/kg	Productos deshidratados
	0,1 g/kg	Productos con grasa vegetal
Pectato de amonio	BPF	Productos saborizados
Pectato de calcio	BPF	Productos saborizados
Pectato de potasio	BPF	Productos saborizados
Pectato de sodio	BPF	Productos saborizados
Polifosfato de calcio	2 g/kg, solo o 3 g/kg combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos esterilizados
	5 g/kg solo o combinado, expresado como sustancia anhidra	Productos deshidratados
Polifosfato de potasio	2 g/kg solo o 3 g/kg combinado	Productos esterilizados
	5 g/kg solo o combinado	Productos deshidratados
	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1,2 g/kg solo o combinado	Productos saborizados
	0,15 g/kg solo o combinado	Leche ultrapasteurizada
Polifosfato de sodio	1,2 g/kg solo o combinado	Productos saborizados
	2 g/kg solo o 3 g/kg combinado	Productos esterilizados
	0,15 g/kg solo o combinado	Leche ultrapasteurizada
	1,2 g/kg solo o combinado	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	5 g/kg solo o combinado	Productos deshidratados
Triestearato de sorbitán polioxietilenado	5 g/kg	Productos saborizados
Trifosfato pentapotásico	0,12 g/kg solo o combinado expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
Trifosfato pentasódico	1,2 g/kg solo o combinado expresado como sustancia anhidra	Fórmula láctea y producto lácteo combinado

6.16.2 En la elaboración de los productos saborizados o aromatizados objeto de esta Norma, únicamente se permite el empleo de los siguientes colorantes:

6.16.2.1 Colorantes.

Tabla 8

ADITIVO	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Amarillo ocazo FCF o amarillo alimentos 3	35
Azafrán (Estigmas de <i>Crocus sativus</i> L.)	BPF
Azorrubina o rojo alimentos 3	100
Beta-apo-8-carotenal o anaranjado alimentos 6	35
Betacaroteno sintético o anaranjado alimentos 5	35

Caramelo Clase I	BPF
Caramelo Clase II	3200
Caramelo Clase III	4000
Caramelo Clase IV	4000
Clorofilas	BPF
Complejos cúpricos de clorofilas	300
Sales de sodio y potasio de complejos cúpricos de clorofilinas	300
Eritrosina o rojo alimentos 14	2
Esteres metílico y etílico del ácido Beta-apo-8-Carotenóico o anaranjado alimentos 7 (éster etílico)	35
Extracto de annatto (Extracto de semillas de <i>Bixa orellana</i>)	0,05 expresado como bixina
Extracto de cochinilla o rojo natural 4	100
Indigotina o azul alimentos 1	100
Ponceau 4R o rojo alimentos 7	80
Riboflavina	10
Riboflavina-5'-fosfato de sodio	10
Rojo allura AC o rojo alimentos 17	140
Tartrazina	150 solo o combinado
Verde rápido FCF o verde alimentos 3	100 solo o combinado

6.16.3 Para los productos sometidos a un proceso de transformación parcial de la lactosa de la leche en glucosa y galactosa, se permiten las siguientes enzimas:

Tabla 9

ADITIVO	LIMITE MAXIMO
Lactasa derivada de <i>Aspergillus niger</i>	BPF
Lactasa derivada de <i>Aspergillus oryzae</i>	BPF
Lactasa derivada de <i>Saccharomyces spp</i>	BPF
Lactasa derivada de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	BPF
Quimosina B derivada de <i>Kluyveromyces lactis</i>	BPF

6.16.4 Saboreadores, saborizantes o aromatizantes.

6.16.4.1 En la elaboración de los productos objeto de esta Norma, se permite el empleo de saborizantes, incluidos los naturales, de acuerdo a las BPF y de conformidad con lo establecido en el acuerdo correspondiente.

6.16.5 Edulcorantes no nutritivos.

Los productos objeto de este ordenamiento, saborizados o aromatizados que empleen edulcorantes no nutritivos deben cumplir con lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994 señalada en el apartado de referencias.

6.16.6 Conservadores.

En la elaboración de los productos objeto de esta Norma no se permite el empleo de conservadores; a excepción de los saborizados o aromatizados en los que sólo se aceptará la presencia de ácido sórbico, ácido benzoico o las sales de sodio o potasio de los ácidos anteriores, como efecto de la transferencia de los ingredientes opcionales.

6.16.7 Para la inclusión de los aditivos o coadyuvantes que no son considerados en el acuerdo y sus modificaciones, o en la presente Norma Oficial Mexicana, se debe cumplir con el procedimiento establecido en el ordenamiento correspondiente.

7. Especificaciones nutrimentales

7.1 Todos los productos, objeto de esta Norma, deben contener de 310 a 670 g equivalentes de retinol/L (1033 a 2333 UI/L), de forma natural o por restauración.

7.2 Todos los productos objeto de esta Norma deben contener entre 5 a 7,5 g/L de Vitamina D₃ (200-300 UI/L).

7.3 Los productos, objeto de esta Norma, adicionados con Vitamina A o D₃ no deben contener cantidades superiores a las establecidas en este ordenamiento.

7.4 Los productos, objeto de esta Norma con modificaciones en su composición, además de cumplir con lo establecido en este ordenamiento, deben sujetarse a lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

8. Muestreo

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud y otras disposiciones que al efecto se emitan.

9. Métodos de prueba

9.1 Para la verificación oficial de las especificaciones sanitarias que se establecen en esta Norma, se deben aplicar los métodos de prueba señalados a continuación:

9.2 Para la verificación de las especificaciones de inhibidores en la leche que se emplee como materia prima, se deben aplicar los métodos establecidos en el apéndice normativo A de este ordenamiento.

9.3 Para la verificación de las especificaciones fisicoquímicas, se aplicarán los métodos establecidos en el apéndice normativo A de este ordenamiento.

9.4 Para la verificación de las especificaciones microbiológicas, metales pesados y metaloides de los productos objeto de este ordenamiento sometidos a pasteurización o deshidratación, se deben aplicar los métodos establecidos en las normas correspondientes señaladas en el apartado de referencias.

9.5 En el caso de *E. coli* se aplicará el método establecido en el apéndice normativo B de la NOM-145-SSA1-1995 señalada en el apartado de referencias y el apéndice normativo B de este ordenamiento.

9.6 Para la determinación de Enterotoxina estafilocócica, en productos sometidos a deshidratación, se debe aplicar el método establecido en el numeral 3 del apéndice normativo B de este ordenamiento.

9.7 Para la determinación microbiológica de los productos esterilizados, se debe aplicar el método de prueba establecido en el apéndice normativo B de la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

9.8 Para la verificación de aflatoxinas, se debe aplicar el método señalado en el apéndice normativo A y considerar el procedimiento de limpieza y descontaminación del material de vidrio y área de trabajo para la determinación de aflatoxinas señalado en el apéndice informativo A de este ordenamiento.

9.9 Para la verificación de la restauración y del contenido de Vitamina A (µg equivalentes de retinol/L) se aplicará el método establecido en el apéndice normativo A de este ordenamiento.

9.10 Para la verificación de la adición de vitamina D₃, se debe aplicar el método de prueba establecido en el apéndice normativo B de este ordenamiento.

10. Etiquetado

10.1 La información comercial: marca, denominación del producto, declaración del contenido, nombre y domicilio del fabricante o importador y país de origen deben cumplir con lo establecido en los ordenamientos legales aplicables, expedidos por la Secretaría de Economía.

10.2 La información sanitaria que debe figurar en la etiqueta de los productos preenvasados objeto de esta Norma, debe sujetarse a lo siguiente:

10.2.1 Generales.

10.2.1.1 La información contenida en las etiquetas debe presentarse y describirse en forma clara, veraz, ser comprobable y no debe inducir a error al consumidor, con respecto al origen y características del producto.

10.2.1.2 Las etiquetas que ostenten los productos preenvasados deben fijarse de manera tal que permanezcan disponibles hasta el momento de su uso y consumo en condiciones normales, y deben aplicarse por cada unidad, envase múltiple o colectivo con caracteres claros, visibles, indelebles y en colores contrastantes, fáciles de leer por el consumidor en circunstancias normales de compra y uso.

10.2.1.3 Los productos destinados a ser comercializados en el mercado nacional, deben ostentar una etiqueta con la información a que se refiere esta Norma en idioma español, independientemente de que también pueda estar en otros idiomas, cuidando de que los caracteres sean al menos iguales en tamaño, proporcionalidad tipográfica y colores idénticos o similares a aquéllos en los que se presente la información en otros idiomas.

10.2.1.4 Cuando en las etiquetas se declaren u ostenten de forma escrita, gráfica o descriptiva, que los productos, su aplicación, ingredientes o cualquier otra característica están recomendados,

respaldados

o aceptados por centros de investigación, asociaciones, entre otros, los cuales deberán contar con reconocimiento nacional o internacional de su experiencia y estar calificados para dar opinión sobre la información declarada. Se deberá contar con el sustento técnico respectivo, el que estará a disposición de la Secretaría en el momento que lo solicite.

Dichas declaraciones deben sujetarse a lo siguiente: La leyenda debe describir claramente la característica referida, estar precedida por el símbolo o nombre del organismo y figurar con caracteres claros y fácilmente legibles.

10.2.1.5 Se permite el uso de leyendas educativas que promuevan el consumo de una dieta recomendable así como de los beneficios generales que ofrecen los nutrimentos al consumidor, siempre y cuando no se relacionen directamente con el producto que las incluya ni con la marca comercial del mismo ni con las declaraciones de propiedades establecidas en el numeral 10.2.2.7.4 de este ordenamiento.

10.2.2 Específicas.

10.2.2.1 Lista de ingredientes.

10.2.2.1.1 En la etiqueta de los productos debe figurar la lista de ingredientes, la cual puede eximirse cuando se trate de productos de un solo ingrediente.

10.2.2.1.2 La lista de ingredientes debe ir encabezada o precedida por el término "ingredientes":

10.2.2.1.3 Los ingredientes deben presentarse por orden cuantitativo decreciente (m/m) y el nombre específico de los mismos, excepto en las clases de ingredientes señalados en la siguiente Tabla, incluyendo los nutrimentos adicionados, en su caso, mismos que deben declararse conforme a los nombres establecidos en el apéndice normativo B de la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

Tabla 10

INGREDIENTES	NOMBRE GENERICO
Leche en polvo deshidratada Leche fluida independientemente de su contenido de grasa	Leche
Suero de mantequilla Suero de queso Suero de leche Concentrado de proteína de leche Proteína de suero Lactosa	Sólidos de leche
Grasas o aceites comestibles Hidrogenadas o parcialmente hidrogenadas	Grasas vegetales
Mezcla de caseinatos	Caseinatos

10.2.2.1.4 Cuando se trate de un ingrediente compuesto y éste constituya el 25% o más, debe ir acompañado de una lista entre paréntesis de sus ingredientes constitutivos por orden cuantitativo decreciente (m/m). Cuando constituya menos de ese porcentaje se debe declarar el ingrediente compuesto, los aditivos que desempeñan una función tecnológica en la elaboración del producto y aquellos ingredientes o aditivos que se asocien a reacciones alérgicas.

10.2.2.1.5 Se debe indicar en la lista de ingredientes el agua añadida, por orden de predominio, excepto cuando ésta forme parte de un ingrediente compuesto.

10.2.2.1.6 Cuando se trate de productos, destinados a ser reconstituidos, pueden presentarse sus ingredientes por orden cuantitativo decreciente (m/m) en el producto reconstituido, siempre que se incluya una indicación como la que sigue: "ingredientes del producto cuando se prepara según las instrucciones de la etiqueta."

10.2.2.1.7 Cuando los productos objeto de esta Norma se hayan sometido a un proceso de irradiación, deben cumplir con lo establecido en el apartado de etiquetado de la NOM-033-SSA1-1993, señalada en el apartado de referencias.

10.2.2.1.8 Los aditivos empleados en la elaboración de los productos objeto de esta Norma, deben declararse de conformidad con lo establecido en el acuerdo y sus modificaciones, a excepción de los saborizantes y las enzimas, los cuales pueden figurar con la denominación genérica.

10.2.2.1.9 Coadyuvantes de elaboración y transferencia de aditivos.

10.2.2.1.9.1 Debe ser incluido en la lista de ingredientes todo aditivo que haya sido empleado en los ingredientes de los productos objeto de esta Norma y que se transfiera a estos últimos en cantidad notable o suficiente para desempeñar en ellos una función tecnológica.

10.2.2.1.9.2 Están exentos de declararse en la lista de ingredientes, los aditivos transferidos a los productos objeto de esta Norma que no cumplen una función tecnológica en el producto terminado, así como los coadyuvantes de elaboración, excepto aquellos que puedan provocar reacciones alérgicas o de intolerancia.

10.2.2.2 Instrucciones para el uso, conservación y preparación.

10.2.2.2.1 Instrucciones de uso:

10.2.2.2.1.1 Para los productos objeto de esta Norma que por diseño del envase requieran instrucciones de uso o consumo especiales, deben incluir una descripción escrita o gráfica de las instrucciones de empleo o preparación.

10.2.2.2.1.2 Los productos destinados a ser reconstituídos deben incluir una descripción escrita o gráfica de las instrucciones de uso, empleo o preparación.

10.2.2.2.2 Deben ostentar las siguientes leyendas de conservación, según corresponda:

10.2.2.2.2.1 Productos pasteurizados:

"Manténgase en refrigeración", "Consérvese en refrigeración" o leyendas equivalentes.

10.2.2.2.2.2 Productos ultrapasteurizados y esterilizados deben incluir lo siguiente:

"Manténgase o consérvese en lugar fresco y seco";

"No requiere refrigeración en tanto no se abra el envase";

"Una vez abierto el envase, manténgase o consérvese en refrigeración", o leyendas equivalentes.

10.2.2.2.2.3 Productos deshidratados:

"Consérvese en un lugar fresco y seco" o una equivalente.

"Una vez preparado el producto, manténgase o consérvese en refrigeración" o leyendas equivalentes.

10.2.2.3 Información nutrimental.

10.2.2.3.1 Los productos objeto de esta Norma, adicionados con vitamina D o con vitaminas A y D, según corresponda, deben hacer figurar su contenido con las siguientes leyendas:

"Contiene _____ g de Vitamina D por L", o

"Contiene _____ g de Vitamina D y _____ g equivalentes de retinol (Vitamina A*)/L".

En el espacio en blanco debe figurar el contenido de dichos nutrimentos, de conformidad con lo señalado en los numerales 7.1 y 7.2 o sus equivalentes por 100 g, por porción o por envase, si éste contiene _____ sólo una porción.

*El término entre paréntesis es opcional.

10.2.2.3.2 Cuando voluntariamente se señalen dentro de la declaración nutrimental, deben figurar como se señala a continuación:

Tabla 11

Nutrimento	Cantidad por 100 g o por porción o por envase
Vitamina A	g equivalentes de retinol
Vitamina D	g

10.2.2.3.3 La declaración nutrimental en la etiqueta es sólo obligatoria cuando se declare alguna propiedad nutrimental o cuando se haya realizado una modificación nutrimental voluntariamente.

10.2.2.3.4 Cuando se incluya la declaración nutrimental, se debe hacer figurar lo siguiente:

- a) Contenido energético;
- b) Las cantidades de proteínas, hidratos de carbono (carbohidratos) disponibles y lípidos (grasas);
- c) La cantidad de sodio;

- d) La cantidad de cualquier otro nutrimento acerca del cual se haga una declaración de propiedades, a excepción de la Vitamina A y D según corresponda, las cuales deben figurar, de conformidad con lo señalado en el apartado 10.2.2.3.1 o 10.2.2.3.2.

10.2.2.3.5 Los productos objeto de esta Norma, sólo podrán ostentar una declaración de propiedad nutrimental, cuando el contenido del nutrimento sea igual o mayor al 5% del IDR/ por porción.

10.2.2.3.6 Los productos con modificación en su composición deben cumplir además con lo señalado en la NOM-086-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias, a excepción de los adicionados con Vitamina A y D los cuales deben cumplir con lo señalado en este ordenamiento.

10.2.2.3.7 Presentación de la información nutrimental.

10.2.2.3.7.1 La declaración nutrimental debe hacerse en las unidades métricas que correspondan y en orden descendente conforme al aporte de nutrimentos del producto. La declaración debe hacerse por 100 g o por porción o por envase, si éste contiene sólo una porción.

10.2.2.3.7.2 La declaración sobre el contenido energético debe expresarse en kJ, de manera adicional, podrá declararse en kcal.

10.2.2.3.7.3 La declaración sobre la cantidad de proteínas, hidratos de carbono (carbohidratos) y lípidos (grasas) que contiene, debe expresarse en gramos.

10.2.2.3.7.4 La declaración sobre el contenido de sodio debe expresarse en mg.

10.2.2.3.7.5 Cuando la declaración numérica sobre vitaminas y minerales, se haga en porcentaje de la ingestión diaria recomendada (IDR), debe emplearse únicamente la tabla de recomendaciones ponderadas establecida en el Apéndice Normativo B de la NOM-086-SSA1-1994, o sus modificaciones; señalada en el apartado de referencias.

10.2.2.3.7.6 Los valores de composición bromatológica que figuren en la declaración, deben ser valores medios ponderados derivados de análisis o de tablas nacionales reconocidas, en este último caso, debe monitorearse periódicamente que exista correlación entre los datos de la tabla y el producto.

10.2.2.4 Información complementaria

10.2.2.4.1 A la nutrimental

Se puede incluir información nutrimental complementaria, la cual en ningún caso debe sustituir la declaración de los nutrimentos del apartado 10.2.2.3.4 y debe cumplir con lo siguiente:

La declaración de los nutrimentos sólo debe realizarse si se tiene asignado un IDR y el contenido de la porción esté por arriba del 5% de la IDR.

a) Todos o ninguno de los componentes o nutrimentos:

Grasa poliinsaturada ___g; grasa monoinsaturada ___g; grasa saturada ___g; colesterol ___mg. (En el espacio en blanco debe indicarse la cantidad del componente o nutrimento).

b) La declaración de uno de los siguientes no requiere la declaración de los otros:

Azúcar ___g; almidón ___g; fibra dietética ___g. (En el espacio en blanco debe indicarse la cantidad del componente o nutrimento).

c) Al expresar los tipos de constituyentes de los lípidos (grasas) y de los hidratos de carbono (carbohidratos) referidos en a) y b) se debe anteponer el texto "del cual..."

d) Número de porciones por presentación.

10.2.2.4.1.1 Cálculos de nutrimentos.

Se deben calcular de conformidad con lo establecido en el Apéndice Normativo C de este ordenamiento.

10.2.2.4.2 A la denominación.

Los productos objeto de esta Norma, deben ostentar junto a la denominación, con el mismo tipo y tamaño de letra la siguiente información:

a) La modificación nutrimental que lo caracterice, de conformidad con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas en su composición. Especificaciones nutrimentales.

b) El texto, "Adicionada con Vitamina D" para los productos adicionados con Vitamina D₃, de conformidad con lo establecido en el numeral 7.2 de este ordenamiento.

10.2.2.4.3 En la superficie principal de exhibición debe declararse el tratamiento térmico al que fue sometido, así como otros tratamientos aplicados para asegurar la inocuidad del producto, establecidos en otros ordenamientos legales correspondientes.

10.2.2.5 Lote.

10.2.2.5.1 Cada unidad debe llevar grabada o marcada de cualquier modo la identificación del lote al que pertenece, la cual debe permitir la rastreabilidad del producto, estar relacionada con la fecha de elaboración y colocarse en cualquier parte del envase. Dicho dato no debe ser alterado u ocultarse en forma alguna.

10.2.2.5.2 Cuando se identifique con la fecha de elaboración, debe anteponerse la palabra "Lote".

10.2.2.5.3 Cuando la identificación corresponda al lote y a la fecha de caducidad, se debe anteponer la leyenda "Lote y Fecha de caducidad" o "lote y caducidad" o leyenda equivalente que no confunda al consumidor.

10.2.2.5.4 En el caso de los productos esterilizados comercialmente deben cumplir con lo establecido en la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

10.2.2.6 Fecha de caducidad.

10.2.2.6.1 Incluir la leyenda "Fecha de caducidad" o caducidad, o leyenda equivalente.

10.2.2.6.2 Para productos pasteurizados al menos: día y mes.

10.2.2.6.3 Para productos ultrapasteurizados: día, mes y año.

10.2.2.7 No se permite el uso de las siguientes declaraciones:

10.2.2.7.1 Declaraciones que impliquen que una dieta recomendable con alimentos o bebidas no alcohólicas ordinarios no puede suministrar cantidades suficientes de todos los nutrimentos.

10.2.2.7.2 Declaraciones, figuras, gráficos u otras que comparen o relacionen los productos sin procesar o sus nutrimentos con un producto procesado preenvasado, incluyendo superlativos.

10.2.2.7.3 Declaraciones de propiedades sin significado.

10.2.2.7.4 Declaraciones de propiedades sobre la utilidad de un producto para prevenir, aliviar, tratar o curar una enfermedad, trastorno o estado fisiológico.

10.2.2.7.5 Declaraciones de propiedades que pueden suscitar dudas sobre la inocuidad de los productos similares o causar, infundir, propiciar o explotar el miedo al consumidor y utilizarlo con fines comerciales.

10.2.2.7.6 Declaración de propiedades que indiquen que el producto ha adquirido un valor nutrimental especial o superior gracias a la adición de nutrimentos.

10.2.2.8 Envases múltiples o colectivos.

10.2.2.8.1 Cuando los productos objeto de este ordenamiento se encuentren en un envase múltiple o colectivo para su venta al consumidor, éste debe contar con la información a que se refiere la presente Norma Oficial Mexicana, en tanto que los envases individuales deben ostentar en sus etiquetas la misma información o sólo la indicación de lote y la leyenda "No etiquetado para su venta individual".

10.2.2.8.2 Cuando el envase esté cubierto por una envoltura, debe figurar en ésta y en cualquier cara del producto visible al consumidor, toda la información sanitaria establecida en este ordenamiento, excepto en los casos en que la etiqueta aplicada al envase pueda leerse fácilmente a través de la envoltura exterior.

10.2.2.8.3 En el caso de que los productos objeto de esta Norma contengan o incluyan productos preenvasados como parte de promociones u obsequios, tales como productos de panificación, cereales, chocolate u otros alimentos, deben incluir en el envase del producto de promoción u obsequio, cuando menos la siguiente información: lista de ingredientes, identificación del responsable del producto, fecha de caducidad y lote.

11. Envase y embalaje

11.1 Envase.

Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a las distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren las características físicas, químicas y sensoriales.

11.2 Embalaje.

Se debe usar material resistente que ofrezca la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

12. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional pero equivale parcialmente a las siguientes normas mexicanas:

12.1 Norma Mexicana NMX-F-368-1983, Alimentos-Leche fluida-Fosfatasa residual-Método de Prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.

13. Bibliografía

13.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F. **Diario Oficial de la Federación**.

13.2 Secretaría de Salud. 1991. Ley General de Salud. México, D.F. **Diario Oficial de la Federación**.

13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. México, D.F. **Diario Oficial de la Federación**.

13.4 Code of Federal Regulations. 1989. Parts 170 to 199. U.S.A.

13.5 FDA Bacteriological Analytical Manual. 1998. 8th Edition (Revisión A)/ Cap. 12. *Staphylococcus aureus*. Gaithersburg, M.D. U.S.A.

13.6 Food and Drug Administration. 1989. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. Department of Health and Human Services. U.S.A.

13.7 The Food and Drugs Act and Regulations. 1989. Canadá.

13.8 Ordennance Sur les exigences hygieniques et microbiologiques relatives aux denrées alimentaires, objets usuels et biens de consommation. 1985. Suiza.

13.9 Ordennance Sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires. 1986. Suiza.

13.10 Alfa-Laval. Manual de Industrias Lácteas. 1990. 2a. De., Iragra, S.A., Bardala, Madrid. España.

13.11 Association of Official Analytical Chemists. 1997. International Official Methods of Analysis 16th De. 3rd. (957.08) 47.3.22.

13.12 Association of Official Analytical Chemists. 1997. International Official Methods of Analysis 16th De. 3.d Rev. (960.49 A) 16.3.03.A.

13.13 Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis 15th Edition, secs 982. 17 Fol. II, AOAC, Arlington, VA.

13.14 Alais Charles. 1988. Ciencia de los alimentos. Principios de Técnica Lechera. Ed. C.E.C.S.A. México, D.F.

13.15 Bacteriological Analytical Manual. 1998. U.S. Food and Drug Administration 8th Edition, Rev. A.

13.16 FAO, Manual of Food Quality Control. 1986. 14/8, pág. 30.

13.17 Judkins, H.F./Keener H.A. 1979. La leche su producción y procesos industriales. Ed. C.E.C.S.A. México, D.F.

13.18 Madrid A. 1992. Los aditivos en los alimentos. Mundiprensa, S.A. Zaragoza, España.

14. Observancia de la Norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los ciento ochenta días naturales contados a partir del día siguiente de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Las especificaciones establecidas en el apartado de etiquetado, entrarán en vigor en planta a los 180 días naturales contados a partir del día siguiente de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

La presente Norma Oficial Mexicana suple a la siguiente Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994, Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 21 de febrero de 1996.

México, D.F., a 1 de agosto de 2002.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Ernesto Enríquez Rubio**.- Rúbrica.

APENDICE NORMATIVO A

A. METODOS DE PRUEBA

Precauciones generales de seguridad.

El analista debe consultar siempre la información respecto a la exposición y manejo seguro de los reactivos químicos especificados en estos métodos, para emplear el equipo de seguridad apropiado como bata de laboratorio, guantes de látex, anteojos de seguridad, mascarilla, etc., y trabajar cuando así se requiera bajo campana de extracción.

Para la aplicación de los siguientes métodos analíticos se debe cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

1. Recolección de la muestra

Utilizar un frasco estéril de vidrio o de plástico provisto de tapón de cierre hermético, libre de fenol. Se recomienda el empleo de tapones de hule. Transportar la muestra en una hielera con refrigerante para lograr una temperatura de 10°C o menos; se debe evitar su congelación.

2. Preparación de la muestra

Antes de proceder al estudio fisicoquímico de la leche, homogeneizar la muestra por agitación e inversión repetida del recipiente que la contiene. En los casos que se observe la formación de grumos, calentar la muestra en baño de agua a temperatura aproximada de 38°C y emplear un agitador con gendarme para facilitar el desprendimiento de la crema adherida a la pared del frasco o del tapón.

Mantener la leche a 20°C al tomar las alícuotas necesarias para los análisis.

3. Determinación de inhibidores

3.1. Derivados clorados (prueba cualitativa).

3.1.1. Principio del método.

Cuando la muestra es tratada con ácido, se libera el cloro presente, si este cloro se hace reaccionar con yoduro de potasio y solución de almidón se desarrolla un color azul cuya intensidad va a depender de la cantidad de cloro presente.

3.1.2. Equipo.

Baño de agua a 85°C.

3.1.3. Materiales.

3.1.3.1. Tubos de ensaye de 16 x 150 mm, o equivalente.

3.1.3.2. Pipetas graduadas de 10 mL.

3.1.3.3. Agitadores de vidrio.

3.1.3.4. Embudos de filtración.

3.1.3.5. Papel filtro.

3.1.3.6. Baño de hielo.

3.1.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

3.1.4.1. Yoduro de potasio (KI). Solución al 7%.

3.1.4.2. Acido clorhídrico (HCl) diluido 1:2. A 100 mL de ácido clorhídrico agregar 200 mL de agua.

3.1.4.3. Solución de almidón (C₆H₁₀O₅)_n. Suspender 1g de almidón en un poco de agua fría, homogeneizar y agregarlo a 100 mL de agua hirviendo, agitar hasta disolución completa, enfriar antes de usar. Utilizar solución recientemente preparada.

3.1.5. Procedimiento.

3.1.5.1. En un tubo de ensaye poner 5 mL de leche y agregarle 1,5 mL de solución de yoduro de potasio al 7%, agregar 4 mL de HCl diluido y mezclar perfectamente con una varilla de vidrio.

3.1.5.2. Colocar los tubos en un baño de agua a 85°C y dejar reposar 10 min. Sacar los tubos, enfriarlos rápidamente y colocarlos en baño de hielo. Filtrar, recoger el filtrado en un tubo de ensaye. Agregar al filtrado 0,5 - 1,0 mL de solución de almidón.

3.1.6. Interpretación de resultados.

La aparición de un color amarillo que va desde el azul hasta el azul morado (de acuerdo con la concentración de cloro presente), indica la presencia de cloro.

3.1.7. Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa

3.2. Sales cuaternarias de amonio (prueba cualitativa).

3.2.1. Principio del método.

Cuando se hace reaccionar el ion cuaternario de amonio en medio alcalino con un indicador (anaranjado de metilo) se forma un complejo que es extraído con cloroformo, el cual en medio ácido da un color magenta.

3.2.2. Materiales.

3.2.2.1. Matraces Erlenmeyer de 125 mL.

3.2.2.2. Mortero de porcelana de 10 cm de diámetro.

3.2.2.3. Embudos de filtración.

3.2.2.4. Tubos de ensaye.

3.2.2.5. Pipetas graduadas de 10 mL.

3.2.3. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

3.2.3.1. Anaranjado de metilo ($C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$). Solución acuosa al 0,15%.

3.2.3.2. Solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH). Disolver 66,5 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.

3.2.3.3. Cloroformo ($CHCl_3$).

3.2.3.4. Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

3.2.3.5. Acido clorhídrico (HCl) 2N.

3.2.3.6. Cloruro de benzalconio [cloruro de n-alquil- (C_{12} a C_{18}) bencildimetil amonio, con un intervalo de peso molecular de 351-380 y conteniendo cadenas de los grupos alquilo con 12 y 16 átomos de carbono], al 0,06%.

Para prepararlo considerar la concentración inicial del reporte del fabricante.

3.2.4. Procedimiento.

3.2.4.1. Colocar 25 mL de leche en un matraz Erlenmeyer, agregar 0,5 mL de solución acuosa de anaranjado de metilo, 1 mL de solución acuosa de hidróxido de sodio y 20 mL de cloroformo, agitar 3 min.

3.2.4.2. Pasar la emulsión resultante a un mortero al que previamente se le han agregado 50 g de sulfato de sodio anhidro, triturar perfectamente, agregar 20 mL de cloroformo y filtrar. Al filtrado agregar 5 mL de ácido clorhídrico 2 N y agitar.

3.2.4.3. Preparar una solución control de color, colocando en un matraz Erlenmeyer 25 mL de leche y 0,5 mL de la solución de cloruro de benzalconio al 0,06%. Proceder igual que en la muestra.

3.2.5. Interpretación de resultados.

Un color magenta cereza en la capa acuosa es una prueba positiva de cantidades mayores de 1 mg/kg de sales cuaternarias de amonio.

3.2.6. Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa.

3.3. Oxidante (prueba cualitativa).

3.3.1. Principio del método.

Esta basado en la formación de un compuesto colorido al hacer reaccionar el agente oxidante (peróxido de hidrógeno) que contenga la muestra con pentóxido de vanadio en presencia de ácido sulfúrico.

3.3.2. Materiales.

3.3.2.1. Tubos de ensaye de 15 mL.

3.3.2.2. Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.

3.3.2.3. Probetas de 100 mL.

3.3.3. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

3.3.3.1. Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6 + 94 (v/v).

En un vaso de precipitados medir 94 mL de agua y lentamente resbalando por las paredes, adicionar 6 mL de H_2SO_4 concentrado.

3.3.3.2. Solución de pentóxido de vanadio (V_2O_5).

Disolver 1 g de pentóxido de vanadio en 100 mL de ácido sulfúrico 6 + 94.

3.3.4. Procedimiento.

En un tubo de ensaye medir 10 mL de leche y agregarle de 0,5 a 1,0 mL del reactivo de pentóxido de vanadio.

3.3.5. Interpretación de Resultados.

La aparición de un color rosa o rojo, indica la presencia de peróxido de hidrógeno (oxidante).

3.3.6. Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa

3.4. Determinación de formaldehído (prueba cualitativa).

3.4.1. Principio del método.

Se basa en la reacción del formaldehído con la sal disódica del ácido cromotrópico formando una coloración de lila a púrpura.

3.4.2. Equipo.

Equipo de destilación Kjeldahl.

3.4.3. Materiales.

3.4.3.1. Matraz Kjeldahl de 800 mL.

3.4.3.2. Material común de laboratorio.

3.4.4. Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

3.4.4.1. Acido fosfórico (H_3PO_4).

3.4.4.2. Sal disódica del ácido cromotrópico ($C_{10}H_8Na_2O_8S_2$).

3.4.4.3. Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

3.4.4.4. Formaldehído (CH_2O) al 37%, densidad = 1,08 g/L.

3.4.4.5. Solución de ácido sulfúrico al 72%.

Verter 150 mL de ácido sulfúrico en 100 mL de agua y enfriar.

3.4.4.6. Solución saturada de sal disódica del ácido cromotrópico.

Disolver 500 mg de sal disódica del ácido cromotrópico en 100 mL de solución de ácido sulfúrico al 72%. Enfriar a temperatura ambiente.

3.4.4.7. Solución de formaldehído de 40 mg/L.

Tomar 1 mL de formaldehído y aforar a 1 L con agua.

3.4.5. Procedimiento.

3.4.5.1. En el matraz de Kjeldahl tomar 100 mL de leche, adicionar 100 mL de agua y acidificar con 2 mL ácido fosfórico adicionando 1 mL de exceso. Destilar 50 mL.

3.4.5.2. En un tubo de ensaye poner 1 mL del destilado y 5 mL de solución saturada de sal disódica del ácido cromotrópico, colocarlo en baño maría a ebullición durante 15 minutos. Observar durante este periodo de calentamiento.

3.4.5.3. Preparar una solución control de color, colocando en un matraz Kjeldahl, 100 mL de leche y 1 mL de solución de formaldehído. Proceder como se describió en los numerales 3.4.5.1. y 3.4.5.2.

3.4.6. Interpretación de resultados.

La aparición de un color lila hasta púrpura indica la presencia de formaldehído.

3.4.7. Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa a formaldehído.

3.5. Inhibidores determinados por pruebas microbiológicas (residuos de antibióticos).

3.5.1. Principio del método.

Las sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano presentes en la leche, se ponen de manifiesto por halos de inhibición medibles, que se forman cuando se impregnan discos de papel filtro con la muestra y se depositan sobre la superficie de una placa de agar inoculado con esporas de *B. stearothermophilus*.

3.5.2. Equipo.

3.5.2.1. Autoclave.

3.5.2.2. Centrífuga (de preferencia refrigerada).

3.5.2.3. Balanza granataria, de dos platillos, sensibilidad 0,1 g y capacidad de 1000 g.

3.5.2.4. Incubadora con termostato que evite variaciones mayores a 1,0°C.

3.5.2.5. Microscopio óptico.

3.5.2.6. Nefelómetro de McFarland.

3.5.2.7. Equipo para tinción de Gram y esporas.

3.5.3. Materiales.

3.5.3.1. Asa y portaasa bacteriológicas.

3.5.3.2. Cajas Petri de vidrio de 100 X 20 mm con tapa de porcelana vidriada en la parte exterior o su equivalente en plástico, colocando un cojinete de papel filtro en la tapa.

3.5.3.3. Discos de papel de 12,7 mm de diámetro gruesos, de velocidad media y con alta retención (S&S 740 E o equivalentes en poder de absorción, calidad y pureza).

3.5.3.4. Matraces Erlenmeyer de 250 mL.

3.5.3.5. Micropipeta con capacidad para medir 90 µL.

3.5.3.6. Pinzas de disección con punta fina.

3.5.3.7. Porta objetos y puente de tinción.

3.5.3.8. Tubos de cultivo de 13 X 100 mm.

3.5.3.9. Tubos de centrífuga de 40 mL o más.

3.5.3.10. Vernier o medidor de halos.

3.5.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

3.5.4.1. Subcultivo de *Bacillus stearothermophilus* variedad Calidolactis LNA 096/98 o ATCC10149.

3.5.4.2. Agar indicador PM.

Ingredientes	Cantidad (g)
Extracto de carne	3,0
Peptona	5,0
Triptona	1,7

Soytona	0,3
Dextrosa	5,25
Cloruro de sodio	0,5
K ₂ HPO ₄	0,25
Polisorbato 80	0,06
Púrpura de Bromocresol	0,06
Agar	15,0

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución completa del agar. Ajustar el pH, si es necesario. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

pH final $7,8 \pm 0,2$. Distribuir en placas como se indica en 3.5.5.5.

3.5.4.3. Caldo soya tripticasa (CST) sin dextrosa.

Ingredientes	Cantidad (g)
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en frascos en cantidades según se requiera. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

pH final $7,3 \pm 0,2$.

3.5.4.4. Agar Soya Trypticasa (AST).

Ingredientes	Cantidad (g)
Peptona de caseína	15,0
Peptona de soya	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución completa de agar. Ajustar el pH, si es necesario. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Enfriar a 50-60°C y distribuir a placas de Petri.

pH final $7,3 \pm 0,2$.

3.5.4.5. Penicilinasas (β - lactamasas). Se pueden adquirir discos impregnados, de marca comercial que funcionan satisfactoriamente.

3.5.4.6. Penicilina G (sustancia de referencia).

3.5.4.7. Solución estéril de NaCl al 0,85% (m/v) (SS).

3.5.4.8. Solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.

3.5.5. Procedimiento

3.5.5.1. Preparación de la solución de trabajo de Penicilina G de referencia.

Pesar 30 mg de Penicilina G de referencia, dentro de una atmósfera de humedad relativa menor a 50%. Disolver en solución amortiguadora de fosfatos para obtener una concentración de 100-1000 Unidades Internacionales/mL. Almacenar en la oscuridad entre 0-4,0°C y usar dentro de los dos días siguientes a su preparación.

3.5.5.2. Preparación del inóculo.

3.5.5.2.1. Mantener el cultivo de *B. stearothermophilus* en medio inclinado de AST, haciendo pases semanales. A partir de este cultivo inocular de 3 a 5 placas de AST, incubar a 55°C -64°C de 18-24 h. Cosechar el cultivo de cada placa con 2-3 mL de SS e inocular 3 matraces conteniendo cada uno 150 mL de CST sin dextrosa. Incubar a 55 - 64 ± 2°C.

3.5.5.2.2. Periódicamente hacer una observación microscópica para determinar el grado de esporulación del cultivo (aproximadamente el 80% del cultivo en 72 h, está en fase esporulada). Centrifugar las células a 5000 rpm durante 15 min.

3.5.5.2.3. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en SS. Repetir el lavado, suspender las células en 30 mL de SS y almacenar entre 0-4,0°C. Esta suspensión puede mantenerse viable durante 6-8 meses. Verificar su viabilidad mediante cultivo en placas de AST.

3.5.5.3. Solución estándar de leche.

Diluir la solución de trabajo de Penicilina G en leche libre de inhibidores para obtener una concentración de 0.008 UI/mL. Usar recientemente preparado o almacenar entre 0-4,0°C durante no más de 2 días, también se puede distribuir en pequeños volúmenes y congelar durante un tiempo no mayor a 6 meses.

3.5.5.4. Control negativo.

Leche fluida con un contenido de grasa de 0,0% a 3,8% y sólidos totales menos del 13%. Comprobar la ausencia de sustancias inhibitoras (comercialmente disponible).

3.5.5.5. Preparación de las placas.

3.5.5.5.1. Inocular el medio de agar indicador PM, fundido y enfriado a 55-64°C con una suspensión de esporas (3.5.5.2.3.), en cantidad suficiente para obtener 1 X 10⁶/mL de medio (cada laboratorio deberá ajustar el inóculo dependiendo de la concentración de esporas obtenida). De esta suspensión, pasar 6,0 mL a placas de Petri y dejar solidificar sobre una superficie nivelada.

3.5.5.5.2. Utilizar las placas recientemente preparadas o almacenar entre 0-4,0°C en bolsas de plástico selladas e identificadas con la fecha de preparación. No usar después de 5 días a su preparación.

3.5.5.6. Prueba preliminar.

3.5.5.6.1. Agregar 90 µL de la muestra, usando micropipeta, asegurarse de que las puntas estén bien colocadas, en posición vertical y en el centro del disco, evitar la introducción de burbujas o colocar sobre la superficie de la muestra bien mezclada un disco de papel sostenido con las pinzas, hasta que se impregne completamente por capilaridad. Eliminar cualquier exceso de leche, tocar ligeramente la superficie interna de la tapa y colocar el disco inmediatamente sobre la placa de agar. Asegurar un completo contacto del papel filtro con el agar, presionar con las pinzas suavemente (repetir esta operación con todas las muestras).

3.5.5.6.2. Colocar un disco control en el centro impregnado con el estándar de leche (0,008 UI/mL de Penicilina G). Marcar e identificar los controles y las muestras. Se recomienda no colocar más de 7 discos por placa: 6 en la orilla y uno en el centro.

3.5.5.6.3. Verificar que todos los discos estén uniformemente absorbidos sin presentar exceso de leche

y colocados en forma adecuada. Invertir las placas e incubar a 55-64°C ± 2°C hasta que se observe una zona de inhibición bien definida (16 - 20 mm) alrededor del disco control.

3.5.5.6.4. Examinar las zonas de inhibición de las muestras y medir los halos con vernier. Las zonas de inhibición ≤ 14 mm se leen como negativo, zonas > 14 mm indican la presencia de inhibidores, lo cual deberá confirmarse.

3.5.5.7. Prueba confirmatoria.

Calentar las muestras a 82°C ± 2 min. Enfriar rápidamente y continuar como se indica en 3.5.5.5. Colocar también discos impregnados de penicilinasas (comerciales) o agregar 0,05 mL de penicilinasas a 5 mL de muestra e impregnar los discos.

3.5.5.8. Controles.

3.5.5.8.1. Cuando se aplica este método, el analista debe estar seguro de que cualquier grado de actividad antimicrobiana detectada, proviene de la muestra y nunca de las condiciones ambientales, del equipo o reactivos usados; ni del propio analista.

3.5.5.8.2. Se requiere, por lo tanto, aplicar las buenas prácticas de laboratorio y los controles adecuados, a lo largo de todo el análisis.

3.5.5.8.3. El control positivo que contiene solución de referencia de Penicilina G a una concentración de 0,008 UI/mL debe producir zonas de inhibición claras y bien definidas de aproximadamente 17-20 mm de diámetro. Si éstas no se presentan, la prueba no demuestra la sensibilidad adecuada y deberá repetirse.

3.5.5.8.4. La sensibilidad de este ensayo es normalmente $\geq 0,008$ UI/mL. El control del diluyente, siempre debe dar resultados negativos.

3.5.5.9. Precauciones al realizar la prueba.

3.5.5.9.1. Para colocar los discos, utilizar pinzas limpias y flameadas.

3.5.5.9.2. Tocar con el disco la superficie de las muestras y permitir que el disco se sature por capilaridad. Las pinzas deben flamearse y enfriarse entre cada muestra.

3.5.5.9.3. Tocar la boca del recipiente con el disco, para eliminar el exceso de leche.

3.5.5.9.4. Colocar el disco sobre el agar a una distancia de aproximadamente 9 mm de la orilla hacia adentro y separados entre cada disco, unos 10 mm como mínimo. Presionar el disco suavemente y asegurarse de que hace contacto toda su superficie con el agar.

3.5.5.9.5. Aplicar el control positivo en el centro de la placa y el control negativo en cualquiera de los seis lugares de la orilla.

3.5.5.9.6. Incubar las placas en posición invertida, en una cámara húmeda, a la temperatura y el tiempo indicados en la metodología.

3.5.5.10. Precauciones en el uso de la micropipeta.

3.5.5.10.1. Homogeneizar la muestra. Fijar la punta a la micropipeta y en posición vertical oprimir el émbolo hasta el primer tope.

3.5.5.10.2. Introducir la punta 1 cm debajo de la superficie de la muestra. Soltar el émbolo y dejar que la punta se llene.

3.5.5.10.3. Si el émbolo se suelta rápidamente, el volumen de leche tomado no será uniforme. Si la punta no está llena en forma correcta, después de soltar el émbolo, descartar y repetir la operación.

3.5.6. Interpretación de los resultados.

Las pruebas: preliminar y confirmatoria, pueden dar lugar a los siguientes resultados:

3.5.6.1. Ausencia de zonas de inhibición en la prueba preliminar: la prueba es negativa a sustancias inhibitorias.

3.5.6.2. Zonas de inhibición alrededor de discos con muestra sin penicilinas y ausencia de zonas de inhibición alrededor de discos tratados con penicilinas, en prueba confirmatoria: la prueba es positiva a residuos de $\hat{\alpha}$ -lactámicos.

3.5.6.3. Presencia de zonas de inhibición de igual tamaño en ambos discos (tratados y no tratados con penicilinas): prueba positiva a sustancias inhibitorias diferentes a $\hat{\alpha}$ -lactámicos.

3.5.6.4. Presencia de zonas de inhibición de menor tamaño (4 mm) en discos tratados con penicilinas que los no tratados, en prueba confirmatoria: prueba positiva a residuos de $\hat{\alpha}$ -lactámicos y a otros inhibidores.

3.5.7. Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa

4. Determinación de fosfatasa residual

4.1. Principio del método.

La muestra se incuba con fenilfosfato en solución reguladora de hidróxido de bario. Si la fosfatasa activa está presente, el fenilfosfato se hidroliza y se forma fenol.



Si la leche utilizada en la elaboración del producto ha sido pasteurizada eficientemente, la fosfatasa se inactiva y no hay hidrólisis.

El fenol formado se determina colorimétricamente haciendo reaccionar con 2,6-dibromoquinonacloroimida (B.Q.C.), obteniéndose un color azul, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 610 nm.

4.2. Equipo.

4.2.1. Baño de agua con control de temperatura a 37-40°C.

4.2.2. Parrilla de calentamiento, de control termostático.

4.2.3. Espectrofotómetro de UV-Visible o fotocolorímetro disponible para utilizarse a 610 nm.

4.2.4. Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

4.3. Materiales.

Todo el material de vidrio utilizado debe someterse a una temperatura entre 85-90°C durante una hora.

4.3.1. Tubos de ensaye de 15 x 150 mm.

4.3.2. Tubos de ensaye con graduación de 0 a 10 mL.

4.3.3. Pipetas graduadas en 0,1 mL de 1, 5 y 10 mL.

4.3.4. Embudos de filtración, tallo corto, de 5 cm de diámetro.

4.3.5. Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

4.3.6. Papel filtro Whatman No. 42 o No. 2 o su equivalente.

4.3.7. Material común de laboratorio.

4.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico y libres de fenol a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

4.4.1. Hidróxido de bario octahidratado $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}]$.

4.4.2. Acido bórico (H_3BO_3).

4.4.3. Metaborato de sodio (NaBO_2).

4.4.4. Cloruro de sodio (NaCl).

4.4.5. Borato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$).

4.4.6. Fenilfosfato disódico ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4$). Cristales libres de fenol. Conservar en congelación o en desecador.

4.4.7. Alcohol butílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$). Punto de ebullición 116-118°C.

4.4.8. Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).

4.4.9. Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$).

4.4.10. 2,6 Dibromoquinonacloroimida (BQC) $\text{C}_6\text{H}_2\text{OBr}_2\text{NCl}$.

4.4.11. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$).

4.4.12. Solución reguladora de hidróxido de bario-borato ($\text{pH } 10,6 \pm 0,15$ a 25°C).

4.4.12.1. Disolver en agua caliente 25 g de hidróxido de bario octahidratado (fresco, no deteriorado), enfriar y diluir a 500 mL. Por separado, disolver 11 g de ácido bórico y diluir a 500 mL. Calentar cada una de las soluciones a 50°C, mezclarlas, agitar y enfriar aproximadamente a 20°C. Filtrar y conservar el filtrado en recipiente perfectamente tapado.

4.4.12.2. Cuando se aplique para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, pasteurizados descremados, sin sabor, diluir 500 mL de este regulador con 500 mL de agua.

4.4.12.3. Cuando se aplique para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, pasteurizados con sabor, diluir esta solución reguladora con un cuarto de su volumen de agua (ejemplo 80 mL de este regulador con 20 mL de agua).

4.4.12.4. Para leche de cabra esta solución reguladora se prepara pesando 26 g de hidróxido de bario octahidratado en lugar de 25 g.

4.4.13. Soluciones reguladoras de trabajo con fenil fosfato disódico.

4.4.13.1. Para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizados.

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 100 mL de una mezcla de 50 mL de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (4.4.12.1.). En caso de que el fenil fosfato disódico no esté libre de fenol debe ser purificado de la siguiente manera:

4.4.13.1.1. Disolver 0,5 g de la sal en 4,5 mL de agua; agregar 0,5 mL de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (4.4.12.) y dos gotas de reactivo B.Q.C. (4.4.18.); dejar en reposo 30 min. Al cabo de este tiempo agregar 2,5 mL de alcohol butílico y dejar en reposo hasta que se separe el alcohol, con objeto de eliminar el color. Eliminar el alcohol con gotero o pipeta Pasteur y descartar.

4.4.13.1.2. Diluir 1 mL de la solución acuosa a 100 mL con el regulador de sustrato (4.4.12.). Calentar la solución a 85°C por 2 min, tapar inmediatamente y guardar en refrigeración. Esta solución madre debe mantenerse en el refrigerador durante algunos días. Al emplearse, desarrollar el color y eliminarlo por extracción como se ha indicado anteriormente. La solución es estable por un año si se encuentra bien guardada y con mínima exposición al aire. Antes de usar, desarrollar el color y reextraer si es necesario.

4.4.13.2. Para productos con sabor.

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 100 mL de una mezcla de 80 mL de la solución de hidróxido de bario (4.4.12.1.) y 20 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

4.4.13.3. Para helados.

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 80 mL de solución de borato-hidróxido de bario (4.4.12.1.) y 20 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

4.4.13.4. Para sorbetes.

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 50 mL de solución de borato-hidróxido de bario (4.4.12.1.) y 50 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

4.4.14. Solución reguladora para desarrollo de color (pH 9,8 ± 0,15 a 25°C).

Disolver 6 g de metaborato de sodio y 20 g de cloruro de sodio en agua y diluir a un litro.

4.4.15. Solución reguladora para dilución de color. (Para el caso que la muestra haya salido fuertemente positiva).

Diluir 100 mL de la solución anterior (4.4.14.) a un litro con agua.

4.4.16. Solución reguladora patrón para calibrar el potenciómetro (0,00996 M, pH 9,18 a 25°C).

4.4.16.1. Disolver 3,80 g de borato de sodio decahidratado en agua y diluir a un litro (en ningún caso debe secarse esta sal en el horno, antes de emplearse).

4.4.16.2. Para evitar contaminación con CO₂ mantener perfectamente tapado el recipiente o protegerlo con un tubo de cal sodada.

4.4.16.3. Esta solución reguladora debe utilizarse dentro de los 10 min siguientes a su extracción del frasco.

4.4.17. Reactivo precipitante de proteínas zinc-cobre.

4.4.17.1. Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado pasteurizados sin sabor y sorbetes.

Disolver 3 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,6 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua y diluir a 100 mL.

4.4.17.2. Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, pasteurizados con sabor y helados.

Disolver 4,5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,1 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua y llevar a un volumen de 100 mL.

4.4.18. Solución de 2,6-dibromoquinonacloroimida (B.Q.C.) (C₆H₂OBr₂NCl).

4.4.18.1. Disolver 40 mg de polvo de BQC en 10 mL de alcohol etílico y conservar esta solución en frasco gotero ámbar. Guardar en refrigeración. La solución es estable durante una semana. Desechar si se torna color café.

4.4.18.2. Antes de usarse los nuevos frascos de BQC deberán ser comprobados preparando curvas patrón con fenol y comparados con los de la solución en buen estado; hacer esta comprobación cuando menos dos veces por año.

4.4.19. Solución de sulfato de cobre para patrones al 0,05%.

Disolver 0,05 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 mL de agua.

4.4.20. Solución de alcohol butílico.

Para ajustar su pH, mezclar un litro de éste, con 50 mL de la solución reguladora para desarrollo de color (4.4.14.). Conservar en frasco de tapón de vidrio esmerilado.

4.4.21. Solución madre de fenol de 1 mg/mL.

Pesar exactamente 1,0 g de fenol, transferir a un matraz volumétrico de un litro y llevar al volumen con agua. Mezclar perfectamente. Esta solución es estable durante varios meses mantenida en refrigeración.

4.4.22. Solución patrón de fenol de 10 µg/mL o 10 unidades/mL (solución de trabajo).

4.4.22.1. Diluir 10 mL de la solución madre (4.4.21.) a un litro con agua y mezclar perfectamente.

4.4.22.2. Para preparar soluciones patrón más diluidas, diluir 5, 10, 30 y 50 mL de esta solución en 100 mL para que respectivamente contengan 0,5; 1,0; 3,0 y 5,0 µg o unidades de fenol por mL. Estas soluciones patrón mantenidas en refrigeración no se deben emplear después de una semana.

4.4.22.3. De manera semejante preparar las soluciones patrón que contengan 20, 30 y 40 unidades por mL.

4.4.22.4. Guardar en refrigeración y permitir que esté a la temperatura ambiente en el momento de su uso.

4.5. Procedimiento.

4.5.1. Preparación de la curva patrón de comparación.

4.5.1.1. En series de tubos (de preferencia graduados en 5 y 10 mL), medir volúmenes adecuados de la solución patrón de trabajo, a fin de obtener un margen favorable de patrones según las necesidades. Se recomienda incluir 0,0 (testigo), 0,5; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0 y 40,0 unidades.

4.5.1.2. Con objeto de aumentar la intensidad del color azul y la estabilidad de los patrones agregar a cada tubo 1 mL de la solución de sulfato de cobre al 0,05% (4.4.19.) y a continuación 5 mL de la solución reguladora para dilución de color (4.4.14.). Llevar a un volumen de 10 mL con agua. Agregar 4 gotas de la solución B.Q.C. (4.4.18.) mezclar y dejar en reposo 30 min, a temperatura ambiente para desarrollo de color.

4.5.1.3. En caso de emplear el procedimiento de extracción con alcohol butílico normal, proceder como se indica más adelante.

4.5.1.4. Hacer la lectura de la intensidad del color con un espectrofotómetro a 610 nanómetros, restar el valor que alcanza la lectura del testigo a la de cada una de las soluciones patrones de fenol; finalmente construir una curva de calibración la cual debe ajustarse mediante el método de mínimos cuadrados (regresión lineal).

4.5.1.5. Si se pretende efectuar una comparación visual de los patrones, se conservan en refrigeración y se prepara una nueva serie cada semana.

Precauciones generales.

La homogenización de la leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado para la determinación de fosfatasa es fundamental antes de desarrollar la técnica. Colocar varios mililitros en un tubo de ensaye pequeño, tapar y guardar en el refrigerador; si es necesario el empleo de un conservador agregar cloroformo en concentraciones de 1-3 mL por cada 100 mL de leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado.

4.5.2. Preparación de la muestra.

4.5.2.1. Leche fórmula láctea o producto lácteo combinado.

4.5.2.1.1. Medir con pipeta 1 mL de muestra preparada de leche en 2 o 3 tubos (se necesita un tubo como testigo y se recomienda preparar dos o más tubos para determinaciones por duplicado); en caso de la leche de cabra emplear 3,0 mL de la muestra.

4.5.2.1.2. Agregar a cada tubo 10 mL de la solución reguladora de trabajo con fenil fosfato disódico (4.4.13.1.) o para las determinaciones cuantitativas en leche cruda; tapar los tubos y mezclar (pH $10,0 \pm 0,15$).

4.5.2.1.3. Calentar el tubo testigo en un baño de agua a ebullición cubierto durante 1 min (la temperatura interna del tubo debe estar entre 85-90°C). Dejar enfriar a temperatura ambiente y mezclar de nuevo con el agitador.

4.5.2.2. Productos saborizados, helados y sorbetes.

4.5.2.2.1. Pesar 1,0 g de muestra (de preferencia por duplicado), colocar en un tubo (si la muestra es pegajosa, pesar en papel encerado de 2,5 x 2,5 cm e insertar el papel con la muestra dentro del tubo). De la misma forma pesar otra cantidad igual que servirá de muestra testigo.

4.5.2.2.2. Calentar el tubo testigo en un baño de agua a ebullición cubierto durante 1 min (la temperatura interna del tubo debe estar entre 85-90°C). Dejar enfriar a temperatura ambiente y mezclar de nuevo con el agitador.

4.5.2.2.3. Agregar a los tubos con muestra 1 mL de la solución reguladora de trabajo correspondiente (4.4.13.), mezclar con el agitador de vidrio. A partir de esta etapa manejar de igual forma el testigo y las muestras.

4.5.2.2.4. Agregar 10 mL de la solución reguladora correspondiente:

Para productos saborizados (4.4.13.2.).

Para helados (4.4.13.3.).

Para sorbetes (4.4.13.4.).

Nota: La temperatura interna del tubo que contiene la muestra testigo que debe estar entre 85-90°C, es controlada con un termómetro sumergido en un tubo de tamaño y volumen igual al de las pruebas.

4.5.3. Determinación de fosfatasa residual. (Esta parte del procedimiento es común a todos los derivados lácteos).

4.5.3.1. Inmediatamente después de agregar la solución de sustrato, incubar los tubos en baño de agua durante una hora a 37-38°C agitando ocasionalmente durante este tiempo. Trasladar los tubos a un recipiente con agua a ebullición durante 1 min. Dejar enfriar los tubos a la temperatura ambiente por inmersión en un recipiente de agua fría.

4.5.3.2. Agregar con una pipeta 1 mL de la solución precipitante de proteínas zinc-cobre correspondiente (4.4.17.) a los tubos de la siguiente manera:

a) Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, sin sabor y sorbetes adicionar la solución (4.4.17.1.).

b) Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, pasteurizados con sabor y helados, adicionar la solución (4.4.17.2.).

4.5.3.3. Mezclar perfectamente el contenido de los tubos. El pH de la mezcla debe estar entre 9,0-9,1; filtrar (empleando embudos de 5 cm de diámetro y papel filtro No. 42 de 9 cm de diámetro o bien el No. 2 o su equivalente). Recoger 5 mL del filtrado en un tubo, de preferencia graduado en 5 y 10 mL.

4.5.3.4. Agregar 5 mL de solución reguladora para desarrollo de color (4.4.14.). El pH de la mezcla debe estar entre 9,3-9,4.

4.5.3.5. Agregar 4 gotas del reactivo B.Q.C. (4.4.18.), mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 30 min para desarrollo de color. En los casos en que se investigue pasteurización deficiente se agregan 2 gotas del reactivo de B.Q.C.

4.5.3.6. Determinar la intensidad del color azul con cualquiera de los siguientes métodos:

a) Método espectrofotométrico.

Leer las intensidades de color del tubo testigo y de las muestras a 610 nm, restar la lectura del testigo de la lectura del tubo de la muestra y convertir el resultado a unidades de fenol, utilizando la curva patrón (4.5.1.).

Ordinariamente se hace innecesaria la extracción con alcohol butílico cuando se emplea el espectrofotómetro. En los casos en que se emplee la extracción con este alcohol, purificar el reactivo como se señala en la valoración de la pasteurización (4.4.13.1.1.), centrifugar la muestra durante 5 min a fin de romper la emulsión y remover el agua suspendida en la capa alcohólica. Después de centrifugar,

con una pipeta capilar provista de bulbo de hule, separar todo el alcohol butílico. Filtrar y recoger el filtrado en la celda del espectrofotómetro y leer a 610 nm.

b) Método visual con escala de patrones.

Comparar los colores de las muestras que dan más de 5 unidades con los tubos de color que contienen patrones de fenol (4.5.1.).

Para obtener resultados cuantitativos en aquellos casos en que haya variaciones entre 0,5 y 5 unidades de color, hacer la extracción con alcohol butílico, agregando 5 mL de alcohol e invirtiendo lentamente varias veces; centrifugar como se señala en el método anterior, si fuera necesario, para aumentar la claridad de la capa alcohólica y comparar el color con los patrones tratados en igual forma.

En aquellas pruebas en las que durante el desarrollo de color se obtengan resultados fuertemente positivos (por ejemplo con 20 unidades o más) y en las cuales no sean suficientes 4 gotas del reactivo de B.Q.C. (4.4.18.) para reaccionar con todo el fenol, hacer diluciones colocando nuevos tubos con volúmenes conocidos que se diluyen a 10 mL con la solución reguladora de dilución de color (4.4.15.) y agregar 2 o más gotas del reactivo B.Q.C. En cada una de estas pruebas diluir el testigo y tratarlo directamente.

De la misma manera en aquellos casos en los que estas nuevas diluciones produzcan nuevamente reacciones fuertemente positivas, todavía será necesario volver a preparar otras diluciones más, hasta que el color quede comprendido entre los de la escala o de la curva del espectrofotómetro.

Para hacer la lectura final, dejar transcurrir 30 min a partir del momento de la adición del reactivo B.Q.C a fin de que se desarrolle totalmente su color. Multiplicar las lecturas de las diluciones por el factor de dilución por 2 en el caso de haber diluido 5 mL; por 10, para aquella dilución inicial 1+9 mL y por 50, en caso de una dilución inicial 1+9 mL, seguida de otra de 2+ 8 mL.

4.6. Cálculos.

4.6.1. Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, pasteurizados u otros productos lácteos donde se mide 1 mL de muestra líquida y se adicionan 11 mL de los reactivos (el volumen total del líquido es de 12 mL) y se emplean 5 mL del filtrado.

$$U. \text{ de Fenol/mL} = C \times 2,4$$

4.6.2. Para productos saborizados, helados y sorbetes donde se pesan 1 g de la muestra y se agregan 11 mL de los reactivos (el volumen total del líquido es de 12 mL) y se emplean 5 mL del filtrado.

$$U. \text{ de Fenol/g} = C \times 2,2$$

donde:

C = concentración de la muestra obtenida de la gráfica de la curva patrón en unidades fenol/mL.

2,2 y 2,4 = Factores de dilución.

4.7. Expresión de resultados.

Unidades de fenol / mL o g.

5. Determinación de vitamina A por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC en fase reversa).

5.1. Principio del método.

Los lípidos son ésteres que en presencia de un álcali cáustico se hidrolizan liberando el material insaponificable, el cual es extraído con un disolvente orgánico. Posteriormente la vitamina A contenida en este material, es cuantificada por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

5.2. Equipo.

5.2.1. Sistema de HPLC que incluye:

5.2.1.1. Bomba binaria LC.

5.2.1.2. Inyector automático o manual de muestras.

5.2.1.3. Detector espectrofotométrico de longitud de onda variable UV-Visible LC.

5.2.1.4. Integrador computarizado LC.

5.2.1.5. Columna Octadecil ODS (20), tamaño de partícula 5 µm, longitud 250 mm x diámetro interno 4,6 mm.

5.2.2. Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg.

5.2.3. Placas de agitación con calentamiento.

5.2.4. Cilindro para gas comprimido de nitrógeno pureza 95%.

5.2.5. Cilindro para gas comprimido de helio pureza 95%.

5.2.6. Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño maría.

5.2.7. Equipo de filtración para la preparación de la fase móvil.

5.2.8. Cronómetro o reloj.

5.3. Materiales.

5.3.1. Matraces volumétricos actínicos o de color marrón con tapón de vidrio o teflón de 50 y 100 mL.

5.3.2. Matraces actínicos o de color marrón de fondo plano, cuello corto de 250 mL.

5.3.3. Matraces, en forma de pera actínicos o de color marrón, de cuello corto y boca esmerilada de 500 mL (que embone en el rotavapor).

5.3.4. Matraces volumétricos actínicos o de color marrón de 10 mL.

5.3.5. Vasos de precipitados de 500 mL.

5.3.6. Embudo de separación cónico, actínicos o de color marrón, con llave de teflón 500 mL.

5.3.7. Embudo tallo corto diámetro 12 cm.

5.3.8. Tapones de teflón huecos hexagonales o actínicos o de color marrón.

5.3.9. Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 mL, de 50 cm de longitud aproximadamente.

5.3.10. Manguera de látex.

5.3.11. Papel filtro mediano No. 1 con diámetro de 18,5 cm.

5.3.12. Pipetas volumétricas con marca de 5 y 4 mL.

5.3.13. Jeringa de vidrio sin aguja desechable de 10 mL.

5.3.14. Jeringa de vidrio de 50 μ L con aguja sin punta.

5.3.15. Filtros para jeringa (acrodiscos para HPLC) de 0,45 μ m de tamaño de poro y diámetro de 25 mm, para solventes orgánicos y fase móvil.

5.3.16. Membranas de filtración de fluoruro de polivinilideno, utilizada para fases móviles (solventes orgánicos y acuosos), cuyos extractables sean de absorción en UV, u otro filtro para fines similares.

5.3.17. Magnetos para placa de agitación.

5.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico y por agua debe entenderse agua destilada.

5.4.1. Estándar de retinol (vitamina A) cristalizada ($C_{20}H_{30}O$) all trans RETINOL con certificado de pureza.

5.4.2. Hidróxido de potasio en lentejas (KOH).

5.4.3. Alcohol etílico absoluto (C_2H_5OH).

5.4.4. Eter de petróleo intervalo de ebullición 40 - 60°C.

5.4.5. Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador ($C_{20}H_{14}O_4$).

5.4.6. Metanol grado HPLC (CH_3OH).

5.4.7. Agua destilada filtrada (sólo para la preparación de fase móvil).

5.4.8. Agua destilada que se utilizará en los lavados del saponificado (verificar que el valor de pH no sea mayor de 6,0).

5.4.9. Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

5.4.10. Acido ascórbico ($C_6H_8O_6$).

5.4.11. Fase móvil metanol: agua (95:5) para HPLC.

Pasar agua destilada a través de una membrana de filtración para soluciones acuosas. Pasar metanol a través de una membrana de filtración para solventes orgánicos. Posteriormente mezclar 50 mL de agua destilada en 950 mL de metanol (fase móvil). Degasificar la fase móvil pasando una ligera corriente de gas helio o por ultrasonido 15 minutos a temperatura ambiente.

5.4.12. Soluciones patrón de vitamina A.

5.4.12.1. Solución concentrada (150 µg equivalentes de retinol).

Justo antes de emplearse, pesar 15 mg de retinol cristalizado (A - OH) y registrar el peso exacto. Colocar el estándar pesado en un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver con metanol y llevar al volumen.

5.4.12.2. Solución intermedia (15 µg equivalentes de retinol).

Diluir 5 mL de la solución concentrada a 50 mL con el mismo metanol para obtener una solución de aproximadamente 50 UI/mL.

5.4.12.3. Solución de trabajo (6 µg equivalentes de retinol).

Añadir 4 mL de la solución estándar intermedia al matraz marcado como estándar y adicionar los reactivos al igual que al blanco y muestra como se indica en el apartado de saponificación. Esta solución tendrá aproximadamente 20 UI/mL de vitamina A, al final del proceso de recuperación, en el matraz volumétrico de 10 mL.

Nota 1:

Si el certificado de % de pureza en el estándar es inferior al 85% no debe prepararse la solución patrón, siendo necesario un nuevo estándar de otro lote con una pureza superior a la antes indicada.

Nota 2:

La vitamina A-OH (A-alcohol) se oxida con gran rapidez y es muy sensible a la luz. Al abrir una ampollita nueva de vitamina A-cristalizada, pesar la cantidad de estándar requerida y guardar la ampollita bajo atmósfera de nitrógeno o en condiciones similares.

5.5. Procedimiento.

Nota 3:

La vitamina A es sensible a la luz. Utilizar material actínico o de color marrón o bien, proteger el material con papel aluminio. Por otra parte efectuar las evaporaciones con rotavapor a una temperatura máxima de 40°C. No evaporar a sequedad. Romper el vacío e inmediatamente introducir nitrógeno al sistema o al matraz. Evaporar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno sin llegar a la sequedad.

5.5.1. Toma de muestra.

En el caso de productos deshidratados, reconstituir con agua, de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g del producto llevados a 1 L con agua. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo.

Medir de preferencia por duplicado una cantidad de muestra tal, que contenga de 30 a 90 µg equivalentes de retinol (100 a 300 UI de vitamina A) o la cantidad correspondiente a lo declarado en la etiqueta de la muestra. En caso de no contar con esta información no es conveniente realizar el análisis.

5.5.2. Saponificación.

5.5.2.1. Marcar 4 matraces actínicos de cuello corto y esmerilado con fondo plano de 250 mL (cuando la muestra se trabaje por duplicado) de la siguiente manera: blanco, estándar y muestra.

5.5.2.2. Añadir los siguientes reactivos a cada uno de los matraces antes mencionados: 7 g de hidróxido de potasio y a continuación añadir 60 mL de alcohol absoluto. Mezclar para disolver. Agregar 0,5 g de ácido ascórbico así como una barra magnética. Adicionar una ligera corriente de nitrógeno a cada uno de los matraces.

5.5.2.3. Montar un sistema de reflujo y calentar durante 30 minutos en placas de calentamiento o baño de agua en ebullición con agitación constante.

Nota 4:

Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

5.5.3. Extracción del insaponificable.

5.5.3.1. Una vez concluido el tiempo de saponificación, enjuagar con máximo 30 mL de agua destilada (evitar el exceso de agua para prevenir la formación de emulsiones) por las paredes internas del refrigerante sin quitar el matraz del saponificado. Enfriar el matraz aún instalado al refrigerante sumergiéndolo parcialmente en un vaso de precipitados que contenga agua fría, lo anterior con la

finalidad de llevarlo a temperatura ambiente, evitando enfriarlo demasiado. Trasvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 mL.

5.5.3.2. Enseguida enjuagar el matraz con 100 mL de éter de petróleo que se añaden al embudo de separación. Extraer la vitamina A agitando ligeramente. Dejar separar las fases. Vaciar la fase acuosa a otro embudo de 500 mL. Recoger la fase orgánica a un tercer embudo de separación de 500 mL. Repetir la operación dos veces más, enjuagando el matraz con dos porciones de 100 mL de éter cada una.

5.5.3.3. Efectuar esta extracción 3 veces en total (un lavado de 50 mL y 2 lavados de 100 mL). Hacer las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

5.5.3.4. Lavar la solución orgánica con porciones de 100 mL de agua adicionándola por las paredes del embudo, agitando suavemente, hasta que el agua del lavado ya no dé reacción colorida con la fenolftaleína. Después del último lavado, esperar de 15 a 30 minutos antes de vaciar la fase acuosa y volver a revisar con el indicador que no exista reacción colorida.

5.5.3.5. Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 10 g de sulfato de sodio anhidro y recoger el filtrado en un matraz de pera de 500 mL, sin dejar secar el filtro. Al final enjuagar el sulfato de sodio contenido en el filtro con 50 mL de éter de petróleo.

5.5.3.6. Evaporar el disolvente en un rotavapor a 40°C y dejar un remanente de aproximadamente 6 mL. Tratar de reducir esta cantidad del disolvente a un volumen de 2 mL aproximadamente mediante una corriente de nitrógeno.

5.5.3.7. Disolver el remanente obtenido con 3 mL de la fase móvil y recolectar cuantitativamente la solución con una jeringa de vidrio. Filtrar la solución a través de un filtro acrodisco de 0,45 μm a un matraz actínico de 10 mL. Lavar el matraz pera con porciones de 2 mL de fase móvil y repetir el mismo procedimiento hasta llegar al aforo del matraz. Hacer lo mismo para cada filtro de blanco, estándar y probar por duplicado.

Nota 5:

Se recomienda acondicionar el acrodisco de 0,45 μm con metanol antes de utilizarlo en la filtración del recuperado.

5.5.4. Condiciones cromatográficas.

5.5.4.1. Fijar los siguientes parámetros de acuerdo con las instrucciones de operación del cromatógrafo.

Columna Octadecil ODS (20), tamaño de partícula 5 μm , longitud 250 mm x diámetro interno 4,6 mm.

Loop de inyección: 20 μL .

Fase móvil: metanol: agua 95:5.

Flujo: 1 mL/min.

Detector: Longitud de onda ajustada a 325 nm.

Registrador: 5 mm/min.

5.5.5. Determinación de vitamina A.

Injectar dos veces los siguientes analitos: primero 20 μL del blanco, después 20 μL de la solución estándar para HPLC (20 UI/mL aprox.) y por último 20 μL de la muestra (del saponificado).

5.5.5.1. En el cromatograma, identificar el pico y tiempo de retención de la vitamina A correspondiente al estándar. Con estos datos, identificar el pico y tiempo de retención de la vitamina A contenida en la muestra.

5.5.5.2. Calcular la altura del pico de la solución patrón y de las muestras en los cromatogramas obtenidos.

5.6. Cálculos.

El contenido de vitamina A, expresado en Unidades Internacionales por L de producto es igual a:

$$\text{UI vitamina A/L} = \frac{h_p \times C \times V \times 1000}{h_s \times m}$$

En donde:

m = toma de ensayo en g o mL.

h_p = altura del pico de la muestra, en mm.

h_S = altura del pico de la solución estándar final, en mm.

C = concentración de la solución estándar final inyectada, en UI/mL para la vitamina A.

V = volumen de solución estándar final, en el cual ha sido diluido el remanente antes de la cromatografía.

Los resultados deben reportarse como μg equivalentes de retinol.

5.7. Expresión de resultados.

μg equivalentes de retinol/ L 1 UI = 0,3 μg equivalentes de retinol (all trans RETINOL)
--

6. Determinación de AFM₁ en leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado por columna de inmovilidad- HPLC.

6.1. Principio del método.

La AFM₁ es extraída por aplicación de la porción de prueba (leche líquida o leche deshidratada reconstituida) a una columna de inmovilidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos ligados a un material de soporte sólido. Así como la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos selectivamente se ligan a la AFM₁ presente para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los otros componentes de la matriz de la muestra son removidos de la columna con agua destilada. La AFM₁ es eluida de la columna con acetonitrilo y cuantificada por HPLC en fase reversa con detección de fluorescencia.

6.2. Equipo.

6.2.1. Sistema HPLC, que incluye:

6.2.1.1. Bomba.

6.2.1.2. Inyector automático o manual de muestras.

6.2.1.3. Columna HPLC C₁₈ de 4.6 x 250 mm, 5 μm de tamaño partícula.

6.2.1.4. Detector de fluorescencia.

6.2.1.5. Integrador de datos o computadora personal con el software adecuado para el control del equipo y procesamiento de datos.

6.2.2. Bomba manual (cuerpo de jeringa de vidrio de 50 mL unida a través de un conector de plástico a un suministro de aire) o manifold para extracción por vacío en fase sólida.

6.2.3. Centrífuga a 1000 rpm.

6.2.4. Mezclador tipo vórtex.

6.2.5. Balanza granataria con una precisión de 0,1 g.

6.2.6. Espectrofotómetro capaz de hacer mediciones de 200 a 400 nm.

6.2.7. Evaporador rotatorio, con control de vacío.

6.2.8. Equipo de filtración Millipore o similar.

6.2.9. Baño de vapor con temperatura controlada.

6.3. Materiales.

6.3.1. Columnas de inmovilidad. Almacenar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.3.2. Tubos de centrífuga de 50 mL.

6.3.3. Vasos de precipitados de 100 mL.

6.3.4. Pipetas volumétricas de 50 mL.

6.3.5. Pipetas graduadas de 10 mL.

6.3.6. Auxiliar de macropipeteado.

6.3.7. Jeringas de vidrio de 50 mL.

6.3.8. Micropipetas digitales de 10 a 100 μL ; 100 a 1000 μL . y 1 a 5 mL.

6.3.9. Puntas para micropipeta.

6.3.10. Filtros para solventes orgánicos de 47 mm y poro de 0,45 μm .

6.3.11. Filtros para solventes acuosos de 47 mm y poro de 0,45 μm .

6.3.12. Filtros para muestras de politetrafluoretileno de 13 mm y poro de 0,45 μm .

6.3.13. Matraces aforados color ámbar de 5, 25 y 100 mL.

6.3.14. Jeringas desechables de 5 mL con aguja.

6.3.15. Frascos vial color ámbar de 5 mL con tapón.

6.3.16. Matraces Erlenmeyer de 250 mL.

6.3.17. Celdas de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz.

6.3.18. Pipetas Pasteur.

6.3.19. Papel filtro Whatman No. 4 o equivalente.

6.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser de grado analítico y por agua debe entenderse agua destilada.

6.4.1. Acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) grado HPLC.

6.4.2. 2-Propanol (isopropanol) grado HPLC.

6.4.3. Agua (H_2O) destilada y grado HPLC.

6.4.4. Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

6.4.5. Patrón certificado de 50 μg AFM_1 en película.

6.4.6. Tripsina (proteasa pancreática), 2000 FIP-U/g.

6.4.7. Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

6.4.8. Solución de ácido sulfúrico 0,018 N.

Disolver 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 2 L con agua destilada.

6.4.9. Soluciones patrón de dicromato de potasio.

6.4.9.1. Aproximadamente 0,25 mM.

Pesar exactamente 78 mg de dicromato de potasio previamente secado en estufa a 100-105°C durante 2 h, y aforar a 1 L con ácido sulfúrico 0,018 M.

6.4.9.2. Aproximadamente 0,125 mM.

Diluir 25 mL de la solución de 0,25 mM a 50 mL con ácido sulfúrico 0,018 M.

6.4.9.3. Aproximadamente 0,0625 mM.

Diluir 25 mL de la solución de 0,125 mM a 50 mL con ácido sulfúrico 0,018 M.

6.4.10. Fase móvil para HPLC.

Agua: isopropanol:acetonitrilo (80:12:8). Filtrar a través de filtro de membrana de 0,45 μm y degasificar.

6.5. Procedimiento.

6.5.1. Preparación de la muestra.

6.5.1.1. Productos líquidos.

Calentar las muestras entre 35 y 37°C en un baño de agua. Filtrar a través de papel filtro Watman número 4 o centrifugar a 1000 x g por 15 minutos. Colectar al menos 50 mL del producto preparado. Para el análisis de productos esterilizados, es recomendable diluir volumen a volumen con agua destilada previo al calentamiento y filtración o centrifugación.

6.5.1.2. Productos deshidratados.

Reconstituir con agua de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g del producto llevados a 1 L con agua a 50°C. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Colectar al menos 50 mL de la leche preparada.

Nota: Para el análisis de caseinatos de sodio, calcio y potasio, es necesario efectuar una hidrólisis enzimática de la porción de prueba previo a la filtración o centrifugación. Para este propósito, proceder de igual forma que con los productos deshidratados, pero adicionando 2 g de tripsina a la porción de prueba antes de colocar el matraz en el baño de agua por 30 minutos.

6.5.2. Calibración del espectrofotómetro:

6.5.2.1. Determinar la absorbancia (A) de las tres soluciones de $K_2Cr_2O_7$ 0,25, 0,125 y 0,0625 mM en ácido sulfúrico, a su máximo de absorción cerca de 350 nm, usando como blanco la solución de ácido sulfúrico 0,018 N.

6.5.2.2. Calcular la absorbitividad molar (ϵ) de cada concentración con la siguiente fórmula:

$$\epsilon = \frac{A \times 1000}{\text{Conc. en mM}}$$

6.5.2.3. Si los tres valores varían, revisar la técnica o el instrumento, promediar los 3 valores para obtener el valor de ϵ .

6.5.2.4. Determinar el factor de corrección (FC) para cada instrumento y celdas en particular, sustituyendo en la siguiente ecuación:

$$FC = \frac{3160}{\epsilon}$$

Donde: 3160 = Valor de ϵ de las soluciones de $K_2Cr_2O_7$

6.5.2.5. Si el valor de FC es $< 0,95$ o $> 1,05$ revisar el instrumento o técnicas, para determinar o eliminar la causa (usar el mismo juego de celdas en la calibración y determinación de la pureza).

6.5.3. Preparación de soluciones patrón de AFM₁.

6.5.3.1. Solución patrón de 2 ng/ μ L.

6.5.3.1.1. Por medio de una jeringa, introducir aproximadamente 2 mL de acetonitrilo dentro del vial sellado que contiene el patrón certificado de AFM₁. Agitar vigorosamente durante 1 minuto en mezclador tipo vórtex y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL usando pequeñas porciones de acetonitrilo. Diluir al volumen con acetonitrilo y mezclar bien.

6.5.3.1.2. Transferir una alícuota de 2-3 mL de esta solución a una celda de cuarzo y registrar el espectro ultravioleta entre 330 y 370 nm, usando acetonitrilo en la celda de referencia. Medir la absorbancia de la solución a la longitud de onda de máxima absorción (la cual es cercana a 325 nm). Determinar la concentración exacta de esta solución empleando la siguiente ecuación:

$$\text{ng AFM}_1/\mu\text{L} = \frac{A \times PM \times 1000 \times F.C.}{\epsilon}$$

En donde:

A= absorbancia a 350 nm.

PM= Peso molecular para AFM₁= 328.

ϵ = coeficiente de extinción para AFM₁= 19,850.

FC= Factor de corrección (calculado en 6.5.2.4.).

6.5.3.1.3. Regresar la solución de AFM₁ al frasco original. Almacenar esta solución en el congelador por un máximo de 2 años, pero verificar su concentración cada 6 meses. Antes de usar esta solución permitir que alcance la temperatura ambiente.

6.5.3.2. Solución patrón de 0,1 ng/ μ L.

Medir un volumen apropiado de solución patrón (6.5.3.1.) en un matraz volumétrico de 5 mL, dado que se transfieran exactamente 500 ng de AFM₁. Diluir al volumen con acetonitrilo y mezclar bien. Esta solución es estable por 2 meses si es almacenada en refrigeración (4°C).

6.5.3.3. Soluciones patrón de trabajo.

Medir un volumen apropiado de solución patrón (6.5.3.1.) en un matraz volumétrico de 5 mL, dado que se transfieran exactamente 50 ng de AFM₁. Diluir al volumen con acetonitrilo:agua (7:3) y mezclar bien (solución de 0,01 ng AFM₁/ μ L). Preparar tres soluciones patrón de trabajo a 0,005; 0,0025 y 0,00125 ng/ μ L, diluyendo alícuotas de la solución anterior 2, 4 y 8 veces, respectivamente, con agua-acetonitrilo (7:3). Estas soluciones son estables 2 meses almacenadas en refrigeración (4°C).

6.5.4. Extracción de la AFM₁ por medio de columnas de inmunoafinidad.

6.5.4.1. Firmemente conectar una columna de inmunoafinidad a la punta de una jeringa de vidrio colocada en la bomba manual o al manifold de vacío.

6.5.4.2. Medir 50 mL de la muestra en el depósito de la jeringa y pasarla a través de la columna de inmunoafinidad a un flujo aproximado de 2-3 mL/min.

6.5.4.3. Lavar la columna con 10 mL de agua destilada a un flujo aproximado de 2-3 mL/min. Pasar de 2-3 mL de aire a través del material de empaque. Descartar los lavados.

6.5.4.4. Desconectar el ensamble del vacío o suministro de aire y eluir lentamente la aflatoxina con 4 mL de acetonitrilo, controlando el flujo. Dejar el acetonitrilo en contacto con la columna por lo menos 3 minutos para asegurar la completa remoción de la toxina ligada. Esto se logra refluendo el acetonitrilo de dos a tres veces. Colectar el eluido en un vial de 5 mL.

6.5.4.5. Evaporar a sequedad a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Adicionar al residuo 200 µL de agua:acetonitrilo (7:3). Agitar y filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y proceder con la cuantificación por HPLC.

6.5.5. Cuantificación por HPLC.

6.5.5.1. Encender todos los componentes del sistema de cromatografía.

6.5.5.2. Fijar los siguientes parámetros cromatográficos de acuerdo con las instrucciones de operación del equipo:

Fase móvil:	Agua:isopropanol:acetonitrilo (80:12:8).
Flujo:	1 mL/min.
Volumen de inyección:	40 µL (equivalente a 10 mL de producto fluido o 1 g de producto deshidratado).
Detector de fluorescencia	Excitación: 360 nm. Emisión: 428 nm.

6.5.5.3. Purgar las bombas del sistema con cada uno de los componentes de la fase móvil.

6.5.5.4. Correr la fase móvil a través de todo el sistema a un flujo de 1mL/min, hasta obtener una línea base estable.

6.5.5.5. Inyectar 40 µL de la solución de trabajo de AFM₁ de la mayor concentración (0,01 ng/µL) y ajustar los controles del detector de fluorescencia para dar al menos un 80% de respuesta del registrador. Repetir las inyecciones 2-3 veces hasta que las áreas del pico son constantes. La aflatoxina eluye en un tiempo aproximado de 9 minutos.

6.5.5.6. El día del análisis, inyectar en secuencia, volúmenes de 40 µL de cada solución patrón de trabajo y preparar una curva de calibración graficando el área del pico contra la concentración de AFM₁ inyectada. Ajustar la curva por método de mínimos cuadrados (regresión lineal).

6.5.5.7. Inyectar del mismo modo 40 µL de cada una de las muestras y determinar la cantidad de AFM₁ en la muestra utilizando la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración como sigue:

$$Y = m x + b$$

En donde:

Y = Area del pico correspondiente a la AFM₁ en la muestra.

m = pendiente.

x = concentración en ng/µL de AFM₁ en la muestra.

b = ordenada al origen.

Despejar x, para obtener los ng/µL de AFM₁ en la muestra.

6.5.5.8. Si el área del pico obtenido para la muestra es mayor que la obtenida para la solución patrón de la mayor concentración, preparar una solución adecuada diluyendo con agua:acetonitrilo (7:3) y volver a inyectar.

6.5.6. Determinación de la eficiencia de las columnas de inmutofinidad.

6.5.6.1. Medir 1 mL de la solución de trabajo de AFM₁ de 0,01 ng/µL en un matraz volumétrico de 10 mL y diluir al volumen agua:acetonitrilo (7:3). Mezclar bien y aplicar el volumen completo a la columna de inmutofinidad. Secar el material de empaque de la columna pasando de 2-3 mL de aire.

6.5.6.2. Eluir la AFM₁ con 4 mL de acetonitrilo y evaporar a sequedad a 40°C con la ayuda de nitrógeno. Reconstituir con 1 mL de agua acetonitrilo (7:3).

6.5.6.3. Inyectar 40 μL al sistema HPLC bajo las condiciones descritas anteriormente. El lote de columnas de inmutofinidat es adecuado si la recuperaci3n de AFM₁ es 80%.

6.6. C3lculos:

Calcular la concentraci3n de AFM₁ en la porci3n de prueba, usando las siguientes f3rmulas:

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} = \frac{\text{ng de AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos de la curva}}{50 \text{ mL} \times (40 \mu\text{L}/200 \mu\text{L})}$$

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} = \frac{\text{ng de AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos de la curva}}{10}$$

Esta f3rmula es aplicable s3lo cuando ninguna diluci3n ha sido efectuada. El factor de diluci3n correspondiente debe ser tomado en cuenta (por ejemplo en el an3lisis de productos esterilizados o cuando la muestra se sale del intervalo de la curva de calibraci3n).

6.7. Expresi3n de resultados.

$\mu\text{g de AFM}_1 / \text{L}$

7. Determinaci3n de materia extraña en leche, f3rmula l3ctea o producto l3cteo combinado.

7.1. Principio del m3todo.

Los insectos enteros, fragmentos de los mismos, pelos de roedor o alguna materia extraña se separan de la muestra por filtraci3n para su identificaci3n al microscopio.

7.2. Equipo.

7.2.1. Balanza anal3tica con 0,1 mg de sensibilidad.

7.2.2. Equipo de filtraci3n al vac3o.

7.2.3. Microscopio binocular estereoscopio con objetivos que pueden ser de 3, 6, 7 y 10 X, oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 X, respectivamente.

7.2.4. L3mpara para el microscopio o luz natural equivalente.

7.3. Materiales.

7.3.1. Embudo B3chner.

7.3.2. Matraz Kitazato.

7.3.3. Vasos de precipitados de 1000 mL.

7.3.4. Caja Petri.

7.3.5. Papel de filtraci3n r3pida para conteo con l3neas paralelas de aproximadamente 5 mm de separaci3n.

7.3.6. Material com3n de laboratorio.

7.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuaci3n se mencionan deben ser grado anal3tico a menos que se indique otra especificaci3n y por agua debe entenderse agua destilada.

7.4.1. Soluci3n de carbonato de sodio ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) al 2%.

Disolver 2 g de carbonato de sodio en agua y llevar al volumen de 100 mL.

7.4.2. Soluci3n de oxalato de sodio ($\text{Na}_2 \text{C}_2 \text{O}_4$) al 3%.

Disolver 3 g de oxalato de sodio $\text{Na}_2 \text{C}_2 \text{O}_4$ en agua y llevar al volumen de 100 mL.

7.4.3. Mezcla de glicerina:etanol 1:3 (v/v) (opcional).

7.5. Procedimiento.

7.5.1. Preparaci3n de la muestra.

7.5.1.1. Productos líquidos.

Mezclar bien todo el contenido de la muestra.

7.5.1.2. Productos deshidratados.

Pesar por duplicado 50 g de leche descremada o 65 g de leche entera y reconstituir ajustando el volumen a 500 mL con agua a 40°C.

7.5.2. Determinación.

7.5.2.1. Filtrar toda la muestra sobre un embudo de succión preparado con papel filtro para conteo, tratando de verterlo uniformemente.

7.5.2.2. Durante la filtración lavar continuamente el papel filtro con agua a 80°C aproximadamente, para evitar la acumulación de partículas que tapen los poros del papel.

7.5.2.3. Pasar el papel filtro a una caja Petri y humedecerla con la mezcla glicerina-etanol (opcional). Examinar al microscopio utilizando una luz suficientemente fuerte que muestre los detalles en el papel filtro.

7.5.2.4. Contar con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea y explorar cada pieza del material dado que algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan.

7.6. Expresión de resultados.

7.6.1. Productos deshidratados.

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor y cualquier materia extraña que se encuentre en 50 g o 65 g de muestra
--

7.6.2. Productos líquidos.

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor y cualquier materia extraña que se encuentre en la cantidad de mL que contenga el envase analizado
--

8. Determinación de humedad en leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, sometidas a deshidratación.

8.1. Principio del método.

Este método se basa en la pérdida de peso debido a la evaporación del agua bajo condiciones establecidas.

8.2. Equipo.

8.2.1. Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

8.2.2. Estufa eléctrica con regulador de temperatura a 100-102°C.

8.3. Materiales.

8.3.1. Desecador de vidrio con sílica gel con indicador de humedad u otro desecante efectivo.

8.3.2. Cápsulas de vidrio, acero inoxidable, níquel o aluminio de 50 a 90 mm de diámetro y de 12 a 25 mm de altura provistos de tapa que cierre herméticamente.

8.3.3. Pinzas metálicas especiales para las cápsulas.

8.4. Procedimiento.

8.4.1. Preparación de la muestra.

8.4.1.1. Cuando se tome la muestra operar tan rápido como sea posible. Evitar la absorción de humedad del medio ambiente durante la preparación de la muestra. Mezclar el producto transfiriéndolo a un frasco seco y bien tapado con capacidad aproximada al doble del tamaño de la muestra. Mezclar cuidadosamente agitando e invirtiendo repetidamente.

8.4.1.2. Sólo para muestras que presentan grumos o terrones, tamizar la muestra a través de una malla número 20 y si es necesario frotar el material a través de la malla y golpear vigorosamente.

8.4.2. Preparación de las cápsulas.

Secar las cápsulas destapadas en una estufa controlada a 100-102°C por una hora. Taparlas e introducir las cápsulas en un desecador y dejarlas enfriar a temperatura ambiente. Pesarlas con una precisión de 0,1 mg.

8.4.3. Secado de las muestras.

En las cápsulas previamente secadas y pesadas, pesar con exactitud y distribuir homogéneamente de 1 a 3 g de muestra. Secar en estufa (100-102°C) durante 4 horas consecutivas, dejando las cápsulas descubiertas, pero manteniendo las tapas correspondientes identificadas cerca de ellas. Al término del periodo, cubrir las cápsulas con sus respectivas tapas e introducir las cápsulas en el desecador. Enfriar a temperatura ambiente y pesar.

8.5. Cálculos.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

En donde:

m_0 = masa en gramos de la cápsula y la tapa.

m_1 = masa en gramos de la cápsula y tapa con la muestra antes de secar.

m_2 = masa en gramos de la cápsula y la tapa con la muestra después de secar.

8.6. Expresión de resultados.

% Humedad

9. Determinación de vitamina D₃.

Seguir el método incluido en el Apéndice Normativo B, apartado 2 de la NOM-131-SSA1-1995, Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales, pero con las siguientes modificaciones:

Preparación de la muestra.

En el caso de productos deshidratados reconstituir con agua, de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g de producto llevado a 1 L con agua. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo.

Medir de preferencia por duplicado una cantidad de muestra que contenga de 0,5 a 1 g de vitamina D₃ (20 a 40 UI).

Cálculos.

El contenido de vitamina D₃, expresado en unidades internacionales por L de producto es igual a:

$$\text{UI vitamina D}_3/\text{L} = \frac{h_p \times C \times V_o \times V_2 \times 1000}{h_s \times m \times V_1}$$

En donde:

m = Toma de muestra en mL.

h_p = Altura del pico de la muestra, en mm.

h_s = Altura del pico de la solución patrón, en mm.

C = Concentración de la solución de patrón inyectado, en UI/mL.

V_o = Volumen en el cual ha sido diluido el residuo antes de la cromatografía preparativa (en general 5 mL = matraz aforado).

V_1 = Volumen del extracto inyectado en la columna preparativa (en general 0,5 mL = volumen de loop de inyección).

V_2 = Volumen en el cual ha sido diluida la fracción después de la cromatografía preparativa (en general 0,3 mL).

Expresión de resultados.

<p style="text-align: center;">μg vitamina D_3/L 1UI= 0,025 μg vitamina D_3 (Colecalciferol)</p>
--

APENDICE NORMATIVO B

**DE LOS METODOS DE PRUEBA
PARA PRODUCTOS DESHIDRATADOS O EN POLVO**

1. Determinación de coliformes totales en placa.

Seguir con lo establecido en la NOM-113- SSA1-1994, citada en el apartado de referencias, pero inoculando 5 placas con 2 mL de la dilución 10^{-1} . Contar las colonias encontradas en cada placa y reportar la suma de UFC por gramo.

2. Determinación de *E. coli*.

Cuando la cuenta de coliformes en placa sea ≥ 10 , confirmar la presencia de *E. coli* siguiendo el método del Número Más Probable (NMP), establecido en la NOM-145-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

3. Determinación de enterotoxina estafilocócica por el método de Elisa.

3.1. Principio del método.

Este método se basa en un inmunoensayo visual el cual proporciona una prueba rápida (4 h), sensible (1,0 ng o más por mL o g), y específica para la identificación de las enterotoxinas A-E estafilocócicas. Sin embargo, con esta prueba no se identifican los serotipos de enterotoxina, en forma individual. La prueba de Elisa se realiza en configuración de "sandwich".

3.2. Equipo.

3.2.1. Equipo TECRA™.

3.2.2. Incubadora a 35-37°C.

3.2.3. Omnimixer, licuadora (o equivalente) para la preparación de los extractos de alimentos.

3.2.4. Centrífuga a 1000 -3000 x g.

3.2.5. Agitador de microplacas (opcional).

3.2.6. Lector de microplacas (opcional).

3.2.7. Balanza.

3.3. Materiales.

3.3.1. Algodón absorbente.

3.3.2. Micropipetas de 50-200 μL y 5-20 μL .

3.3.3. Puntas de plástico para micropipeta.

3.3.4. Plástico para envolver o sellar recipientes de plástico.

3.3.5. Papel pH (intervalo 0-14).

3.3.6. Frascos de plástico de 500 mL.

3.3.7. Jeringas de plástico de 25 mL.

3.3.8. Tubos para centrífuga.

3.3.9. Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm.

3.3.10. Polietilen glicol (PEG, peso molecular de 15,000-20,000).

3.3.11. Tubo de diálisis (12,000-14,000 peso molecular exclusión).

3.3.12. Vasos de precipitados de 250 mL.

3.3.13. Filtros tipo jeringa (para filtrar los alimentos). Preparar jeringas de plástico desechables (0,25 mL) e insertar suficiente cantidad de algodón absorbente, para hacer un empaque de 0,5 cm. Pasar 5,0 mL de agua destilada, presionar con el émbolo para asegurarse de formar un paquete firme. Preparar inmediatamente antes de filtrar los extractos de alimento, para tratar con el aditivo provisto con el equipo.

3.3.14. Placa de 48 o 96 pozos recubiertos con el grupo de antisueros *.

3.3.15. Soporte para sostener la placa *.

3.3.16. Instructivo del método *.

3.3.17. Comparador de color *.

9.3.18. Hoja de resultados *.

* Materiales suministrados por el fabricante.

3.4. Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

3.4.1. Solución amortiguadora Tris 0,25 M (30,28 g TRIS/L, pH 8,0).

3.4.2. Solución de hidróxido de sodio 1,0 N (NaOH).

3.4.3. Acido clorhídrico (HCl).

3.4.4. Agua destilada o deionizada.

3.4.5. Hipoclorito de sodio.

3.4.6. BHI con 0,7% de agar (m/v).

3.4.7. Solución de lavado. Contiene: 1,5 g de tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 6g de NaCl, 2,0 g polioxietileno sorbitano monolaurato (Tween 20), y 0,001 g de timerosal en 25,0 mL de H₂O *.

3.4.8. Aditivo para la muestra. Es una solución que contiene: 2 g de Tween 20 y 0,001 g de timerosal en 6,0 mL de H₂O *.

3.4.9. Control positivo: Diluir 25 µL de control positivo concentrado (toxina estafilocócica tipo B, 0,1 g Na₂B₄O₇, 0,1 g de NaCl y 0,001 g de timerosal en 4,0 mL de H₂O), en 2,5 mL de sol. de lavado (3.5.2.1.) *.

3.4.10. Control negativo. Contiene: 0,0072 g de Tris, 0,1 g de NaCl, 0,001 g de timerosal y 0,01 g de Tween 20 en 6,0 mL de H₂O *.

3.4.11. Diluyente del Conjugado. Contiene: 0,2 g Na₂B₄O₇, 0,1 g de NaCl, 0,1 g de gelatina, y 0,001 g de timerosal en 13,5 mL de H₂O *.

3.4.12. Conjugado liofilizado. Un frasco que contiene antisuero polivalente (A-E) liofilizado, conjugado; 0,003g de Na₂B₄O₇, 0,002 g de CaCl₂, y 0,0001 g de timerosal. Para su uso, agregar al frasco 13 mL del diluyente (3.4.11.) *.

3.4.13. Diluyente del Substrato. Cada 26 mL de H₂O contienen 0,2 g de ácido acético y 0,01 g de H₂O₂ *.

3.4.14. Substrato. Un frasco de liofilizado que contiene; 0,01 g de 2,2'-di-azino(sulfonato de 3-etil benzotiazolin), 0,01 g de EDTA, y 0,1 g de NaH₂PO₄. Para su uso, agregar al frasco 26 mL del diluyente (3.4.13.) *.

3.4.15. Solución para detener la reacción (solución stop). Cada 6,0 mL contienen; 1,5 g de NaF en 6,0 mL de agua *.

* Reactivos suministrados por el fabricante.

3.5. Procedimiento.

3.5.1. Preparación de las muestras.

3.5.1.1. Productos fluidos y productos deshidratados.

Pesar 25 g de leche deshidratada y agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8.0 (3.4.1.). Continuar como se indica para leche fluida. En muestras de 5,0 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-

8,0. Agregar 50 µL de aditivo (3.4.8.). En el caso de extractos más claros, ajustar el pH a 4,0 con HCl concentrado. Para muestras de leche de 50 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50 µL de aditivo (3.4.8.). Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g. Decantar el extracto y pasar 5,0 mL aproximadamente, a través de una jeringa empacada con algodón absorbente humedecido previamente, y recibir en un tubo de polipropileno. Ajustar nuevamente el pH a 7,0-8,0 (usar papel pH). Agregar 50 µL de aditivo (3.4.8.) y mezclar.

3.5.1.2. Ingredientes deshidratados.

Agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 a 25 g de muestra, homogeneizar en licuadora (a velocidad alta), durante 3 min. Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g y recoger el extracto (sobrenadante). Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente y con cuidado, pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido.

Tomar 5,0 mL de eluido y ajustar el pH a 7,0-8,0. Agregar 50 µL de aditivo, y mezclar.

3.5.1.3. Quesos.

Agregar 50 mL de agua a 25 g de muestra y homogeneizar en licuadora durante 3 min a velocidad alta. Ajustar, con HCl concentrado, a pH 4 (usar papel pH). Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente, y pasar 5 mL del extracto a la jeringa. Insertar el émbolo y con cuidado pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5 mL del eluido, y agregar solución de NaOH para ajustar a pH 7,0-8,0; agregar 50 µL de aditivo, y mezclar.

3.5.1.4. Otros alimentos.

Agregar 50 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 a 25 g de muestra, y homogeneizar en licuadora durante 3 min a velocidad alta. Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente, y pasar 5,0 mL de extracto a la jeringa, insertar el émbolo y con cuidado presionar el émbolo y recoger el eluido. Tomar 5 mL del eluido, ajustar a pH 7,0-8,0, si es necesario; agregar 50 µL de aditivo, y mezclar.

Nota 1:

Preparar los extractos de alimentos inmediatamente antes de realizar la prueba.

Precauciones generales.

En caso de alimentos crudos fermentados, procesados o enlatados, con evidentes defectos; o de cultivos fluidos obtenidos en el laboratorio, que pudieran dar como resultado el crecimiento de microorganismos productores de peroxidasa, es necesario, antes de hacer la determinación de toxina, verificar si los extractos de alimentos o preparados a partir del cultivo en el laboratorio, contienen peroxidasa, debido a que esta enzima podría interferir con la interpretación de los resultados.

Para determinar la presencia de peroxidasa, agregar 50 µL del sustrato (3.4.14.), en una placa de microtitulación sin tratar (no contiene anticuerpos para la enterotoxina estafilocócica). Dejar en reposo 10 min. Si el color cambia a azul o azulverdoso, indica que la muestra contiene peroxidasa intrínseca; la cual debe inactivarse. Si la muestra permanece incolora (o con el color original), realizar el análisis de enterotoxina. Para inactivar la peroxidasa intrínseca, preparar una solución al 30% (m/v) de azida de sodio y agregar 1 mL de esta solución a 4 mL de muestra (la concentración final de la azida de sodio es de 6% (m/v). Mezclar y agregar un poco de aditivo (3.4.8.), dejar en reposo 1-2 min a temperatura del laboratorio (20-25°C). Repetir la prueba para determinar presencia de peroxidasa, como se describió anteriormente. Si la reacción es incolora o presenta el color original, continuar con la prueba.

Precaución:

Desechar los materiales que contienen azida de sodio, de acuerdo con la NOM.

Nota 2:

Para alimentos crudos (ejemplo: verduras), seguir las precauciones generales señaladas anteriormente.

3.5.2. Preparación de reactivos.

3.5.2.1. Reconstitución de la solución de lavado.

Diluir, en un frasco de reactivos la solución concentrada (como lo indique el fabricante), con agua destilada o deionizada, para obtener 2 L. Utilizar esta "solución de lavado" para lavar los pozos y diluir el control positivo. Es recomendable el uso de pizeta. Almacenar a 4°C, cuando no se use.

3.5.2.2. Preparación del conjugado.

Agregar el diluyente del conjugado y rehidratar a temperatura del laboratorio. Mezclar suavemente. Esta preparación es el "Conjugado reconstituido".

3.5.2.3. Preparación del sustrato.

Disolver el sustrato con el diluyente (3.4.13.), asegurarse que el contenido se haya disuelto completamente. Dejar a la temperatura del laboratorio (20-25°C), antes de su uso.

Precauciones generales:

- ◆ Observar la fecha de caducidad del equipo adquirido. Es la última fecha en la cual el producto debe utilizarse. Preparar todos los reactivos con cuidado y anotar la fecha de reconstitución, en la etiqueta externa de la caja. Usar los reactivos dentro de los 65 días a la fecha anotada en la etiqueta. Refrigerar todos los componentes (2-8°C) cuando no estén en uso. NO CONGELAR.
- ◆ El equipo de inmunoensayo visual está preparado para utilizarse como una unidad integral; por tanto, no se deben mezclar los componentes de diferentes lotes.
- ◆ Utilizar puntas nuevas para cada muestra de alimento. Evitar la contaminación cruzada al llenar los pozos. Si se usan propipetas de plástico para distribuir el conjugado y el sustrato, se deben mantener siempre por separado. Asegurarse de no confundir las tapas de los reactivos.
- ◆ Usar controles positivos y negativos en cada prueba.
- ◆ Preparar recipientes con solución al 2% de hipoclorito de sodio para desechar todas las muestras y materiales que contengan toxina.
- ◆ Mantener los pozos removibles que no se usen dentro del paquete y volver a sellar con cinta, después de cada uso.

3.5.3. Determinación de la enterotoxina.

3.5.3.1. Preparación de los pozos.

Tomar del paquete el número necesario de pozos; uno para cada muestra, uno para control positivo y uno para control negativo. Si se requiere, pueden utilizarse pozos adicionales (control positivo y negativo en alimento).

3.5.3.2. Prelavado.

Con la ayuda de una pizeta llenar cada pozo con solución de lavado y dejar en reposo durante 10 minutos a la temperatura de laboratorio (20-25°C). Vaciar los pozos por inversión rápida del soporte (placa); eliminar completamente todo residuo de líquido, golpeando varias veces, firmemente hacia abajo la placa, sobre una toalla de papel absorbente.

3.5.3.3. Colocación de las muestras.

Pasar alícuotas de 200 µL de los controles y muestras (extractos de alimento o de cultivos) dentro de pozos individuales. Registrar la posición de cada muestra en la hoja de registro específica. Golpear suavemente la placa para asegurarse de la distribución homogénea y del contacto de las muestras con las paredes de los pozos; el uso de un agitador de microplacas durante 30 segundos, es opcional. Cubrir los pozos con una película plástica, estirable, autoadherible o sello especial de microplacas; para evitar la evaporación. Incubar 2 hrs. a 35-37°C.

3.5.3.4. Segundo lavado.

Presionar firmemente los pozos en la placa e invertir rápidamente. Vaciar el contenido de los pozos en el recipiente de desecho (con hipoclorito de sodio al 2%). Eliminar el residuo de líquido golpeando energicamente, varias veces la placa invertida, sobre una toalla de papel absorbente; llenar completamente los pozos con solución de lavado, y repetir el lavado en la misma forma, de 2 a 3 veces más y finalmente vaciar los pozos.

Nota 3:

El lavado profundo de los pozos es un paso crítico y asegurará una clara interpretación de los resultados.

3.5.3.5. Adición de conjugado.

Agregar 200 µL del conjugado reconstituido (enzima) a cada pozo. Volver a cubrir la placa e incubar 1 h a temperatura de laboratorio (20-25°C). Vaciar las placas y lavar profundamente, 5 veces, como se describió anteriormente (3.5.3.4.).

3.5.3.6. Adición del sustrato.

Agregar, a cada pozo, 200 µL del sustrato reconstituido. Dejar a temperatura del laboratorio (20-25°C) durante 30 min, como mínimo, hasta que el control positivo alcance la máxima absorbancia (mayor a 1,0) o al color más intenso que el número 4 del comparador de color. El desarrollo de color tiende a concentrarse alrededor de las orillas de los pozos. Para obtener resultados más precisos, golpee con suavidad los extremos de la placa, con el propósito de que el contenido de los pozos se mezcle bien antes de la lectura. Agregar a cada pozo 20 µL de solución stop; golpear con suavidad, para mezclar los contenidos.

3.5.3.7. Determinar los resultados visualmente o mediante un lector de microtitulación.

3.6. Interpretación de los resultados:

3.6.1. Colocar la placa que sostiene los pozos sobre un fondo blanco. Comparar el color de cada pozo con el comparador de color. El control positivo de toxina (y el control positivo de alimento, si se usó) deben dar un color verde intenso, lo que indica que todos los reactivos han funcionado. Si el control negativo es significativamente más oscuro que el representado en comparador de color, significa que hubo, probablemente, un lavado inadecuado y la prueba debe repetirse.

3.6.2. La muestra se considera positiva, si cumple los siguientes criterios:

- El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y
- Las muestras presentan un color verde o azul más oscuro que el intervalo negativo representado en el comparador de color.

3.6.3. La prueba de enterotoxina se considera negativa, si se cumplen los siguientes criterios:

- El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y
- La muestra es incolora o tiene el color dentro del intervalo negativo, representado en el comparador de color.

3.7. Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa para enterotoxina estafilocócica

Cuando se obtengan resultados positivos, éstos tendrán que ser confirmados por el método de doble difusión en gel en laminilla, establecido en la NOM-115-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

APENDICE INFORMATIVO A

A. PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESCONTAMINACION DEL MATERIAL DE VIDRIO Y AREA DE TRABAJO PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS

1. Objetivo

Por la naturaleza y potenciabilidades tóxicas de las aflatoxinas es importante establecer directrices para la descontaminación del área de trabajo, material y equipo utilizados, así como los procedimientos a seguir para neutralizar derrames y remanentes de extractos de las muestras.

El trabajo de limpieza y descontaminación será realizado por personal capacitado y que cuente con equipo protector como una bata, guantes impermeables y lentes protectores.

2. Descontaminación del material de laboratorio

Todo el material de vidrio del laboratorio que haya sido utilizado durante el análisis debe sumergirse en una solución de hipoclorito, el cual se prepara diluyendo una parte de solución comercial de hipoclorito de sodio o clarasol (con una concentración entre 5 y 6%) con 10 partes de agua, por ejemplo mezclar 100 mL de blanqueador comercial con 1000 mL de agua.

Después del tratamiento, el material debe enjuagarse abundantemente con agua corriente seguido de agua destilada, secar por escurrimiento o en estufa de 90-100°C.

3. Descontaminación del área de trabajo

La superficie de las mesas de trabajo y las paredes en las que pudiera haberse contaminado de leche con aflatoxinas, deben limpiarse con una toalla desechable impregnada en solución de hipoclorito de sodio o solución blanqueadora comercial después de cada sesión.

4. Descontaminación de material desechable

Todo el material desechable como son las columnas y placas deben sumergirse durante un mínimo de 5 min en una solución de hipoclorito de sodio utilizando una parte de blanqueador comercial y diez partes de agua. La solución descontaminadora ya usada debe eliminarse por el drenaje y los materiales desechables tratados deben empacarse en una bolsa de plástico sellada para colocarse en el depósito de desechos.

5. Tratamiento de derrames

Los derrames de soluciones de aflatoxinas deben tratarse inmediatamente con hipoclorito de sodio o blanqueador doméstico y verterlo directamente del envase, recoger los líquidos con un papel absorbente, el cual también se colocará en una bolsa de plástico.

6. Tratamiento de remanentes de extracto de muestras

Una vez que se ha separado una alícuota del extracto de la muestra es frecuente que permanezca un remanente del mismo. Estos restos de extractos deben tratarse con una cantidad de blanqueador equivalente a la unidad del volumen del residuo a tratar. Los líquidos resultantes se deben acumular en un recipiente para desechos líquidos y eliminarse en un lugar destinado especialmente para este propósito.

APENDICE INFORMATIVO B

B. LISTA DE SUSTANCIAS DESINFECTANTES RECOMENDADAS

No.	Solución acuosa de:	Concentración máx. del ingrediente activo	Condiciones de empleo
1	Hipoclorito cálcico, sódico o potásico, con o sin bromuro cálcico, sódico o potásico.	200 mg/kg de halógeno calculado en cloro.	Escurrir después del tratamiento. No precisa aclarado final
2	Acido di y tricloroisocianúrico, o sales potásicas o sódicas de estos ácido con o sin bromuro potásico, cálcico o sódico.	100 mg/kg de halógeno calculado en cloro.	Como en 1
3	Yoduro potásico, p-toluensulfocloramida sódica y lauril sulfato sódico.	25 mg/kg de yodo valorable; el nivel de los componentes no debe superar el mínimo preciso para obtener el efecto funcional deseado.	Como en 1

4	yodo butoxi-monoéter de etilenglicol + butoximono-éter de propilenglicol+ butoximonoéter de polialquilenglicol, teniendo un punto de niebla de 90-100°C. en solución al 0.5% y un peso molecular medio de 3,300 y monobutiléter de etilenglicol. Monoetil-éter de dietilenglicol se puede adicionar como componente opcional.	25 mg/kg de yodo. Los adyuvantes utilizados con el yodo no deben de superar la cantidad mínima necesaria para obtener el efecto funcional deseado.	Como en 1
5	Yodo, ácido hidroyódico -(p-monofenil-W-hidroxipolil (oxietileno) (peso molecular medio 748) y/o polioxietilen-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 1,90). Alcohol isopropílico se puede adicionar como componente opcional.	Como en 4	Como en 1
6	Yodo, yoduro de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y polioxietilen-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 1,900).	Como en 4	Como en 1
7	Acido dodecibencenosulfónico, polioxietilen-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 2,800).	400 mg/kg de ácido dodecil-benceno-sulfónico y 80 mg/kg de polioxietilen-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 2,800).	Estas soluciones se emplean en la limpieza de equipo y utensilios, así como en botellas y envases para leche; no precisan aclarado final.*
8	Yodo, butoxi-monoéter de etilen glicol+butoxi-monoéter de propilenglicol+butoximono-éter de polialquilenglicol, con un peso molecular medio mínimo de 2,400, y -lauril-W-hidroxipoli (oxietileno) con un promedio de 8-9 moles de óxido de etileno y un peso molecular medio de 400.	Como en 4	Estas soluciones se emplean en la limpieza del equipo y utensilios, así como de envases de leche y otras bebidas. Como aclarado preliminar se puede utilizar agua a la que se ha añadido esta solución. No se debe emplear en el enjuagado final.*

9	Cloruro de n-alkil-(C ₁₂ a C ₁₈) bencildimetil-amonio, con un promedio de peso molecular de 351-380 y conteniendo principalmente cadenas de los grupos alquilo con 12 a 16 átomos de carbono, con o sin grupos alquilo de 8 a 10 átomos de carbono, en una proporción máxima de 1% respecto a los de 12-16. Se puede añadir como componente opcional alcohol isopropílico.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activos.	Como en 1
10	Tricloromelamina y lauril sulfato sódico o ácido dodecibenceno sulfónico.	Tricloromelamina, en cantidad no superior a la necesaria para producir 200 mg/kg de cloro y lauril sulfato sódico, a un nivel que no exceda del mínimo requerido para que se presente el efecto funcional deseado o, ácido dodecibenceno sulfónico en proporción no superior a 4000 mg/kg	Estas soluciones se emplean en la limpieza de envases para bebidas, excepto leche, así como en la higienización del equipo y utensilios y otros materiales, que puedan contactar con alimentos. No precisan aclarado final.*
11	Volúmenes iguales de cloruro de n-alkil (C ₁₂ a C ₁₈) bencildimetilamonio y cloruro de n-alkil (C ₁₂ a C ₁₈) dimetilbencilamonio, con un peso molecular medio de 384.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternarios activos.	Estas soluciones se utilizan en el tratamiento de equipo y utensilios, así como las superficies que contactan los alimentos, en establecimientos de comidas públicas. No precisan aclarado final.*
12	Sal sódica del ácido oleico sulfonato, polioxietileno-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque, con un peso molecular medio de 2,000 y con 27 a 31 moles de polioxipropileno.	200 mg/kg de ácido sulfonato, sal sódica.	Esta solución se utiliza para botellas u otros envases de vidrio para leche, así como para el equipo y utensilios empleados en la elaboración de alimentos. Los artículos tratados con esta solución se deben escurrir durante 15 min antes de ponerlos en contacto con los alimentos. No precisa aclarado final.*
13	Yodo y alquil (C ₁₂ - C ₁₅) monoéter de etilen y propilenglicol+ monoéter de polialquilenglicol, con un punto de niebla de 70-77°C en solución acuosa al 1% y con un peso molecular medio de 807.	Como en 4	Como en 1

14	Yodo, butoxi-monoéter de etilen y propilenglicol+butoximonoéter de polialquilenglicol, con un punto de niebla de 90-100°C, en solución acuosa al 0,5% y con un peso molecular medio de 3,300 y polioxietileno-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque, con un peso molecular medio mínimo de 2,000.	Como en 4	Como en 1
15	Hipoclorito de litio	290 mg/kg de cloro y 30 mg/kg de litio.	Como en 1
16	Cantidades iguales de cloruro de n-alkil (C ₁₂ -C ₁₈) bencil-dimetil-amonio y cloruro de n-alkil (C ₁₂ a C ₁₄)-dimetil-(etil-bencil)-amonio (con pesos moleculares medios de 377-384). De forma opcional se puede adicionar etilen-diaminote-tracetato tetrasódico y/o α-(p-nonil-fenol)-w-hidroxiopoli (oxietileno con un contenido de 11 moles.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activo.	Como en 1
17	Cloruro de di-n-alkil (C ₈ - C ₁₀)-dimetilamonio y alcohol isopropílico, con un peso molecular medio de 332-361	150 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activo.	Como en 1
18	Cloruro de n-alkil (C ₁₂ -C ₁₈) bencil-dimetil-amonio, metaborato sódico, α-terpinol y α-p-(1,1,3,3 tetrametil-butil)fenil-w-hidroxiopoli (oxietileno), producido con 1 mol de fenol y 4-14 moles de óxido de etileno	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activos y 66 mg/kg de α-(1,1,3,3 tetrametil-butil)fenil-w-hidroxiopoli (oxietileno).	Como en 1
19	Di-cloro-iso-cianurato sódico y etilen-diamino-tetracetato tetrasódico.	100 mg/kg de cloro.	Como en 11
20	o-fenil-fenol, o-bencil-p-cloro fenol, p-amilfenol, sulfato de α-alkil- (C ₁₂ a C ₁₅)-w- hidroxiopoli- (oxietileno) y sodio con un contenido medio de polioxietileno de 1 mol, sales potásicas de ácidos grasos de aceite de coco y alcohol isopropílico o hexilenglicol.	800 mg/kg de fenoles activos totales, que comprenden 400 mg/kg de o-fenil-fenol 320 mg/kg de o-bencil-p-clorofenol y 80 mg/kg de p-amifenol terciario.	Únicamente para aplicaciones de un solo uso.
21	Dodecil-benceno-sulfonato sódico.	Entre 25 y 430 mg/kg del producto.	Como en 1

*En otros países, entre los que no se incluyen Estados Unidos, es obligatorio el aclarado final con agua después de aplicar la solución desinfectante.

Los fabricantes podrán emplear otras sustancias para la limpieza y desinfección de equipo, siempre y cuando se asegure que los productos obtenidos son inocuos para el consumidor.

APENDICE INFORMATIVO C

1. Cálculos de nutrimentos

1.1. Cálculos de energía.

1.1.1. La cantidad de energía que se indique, debe calcularse utilizando los siguientes factores de conversión:

Hidratos de carbono (carbohidratos).

17 kJ o 4 kcal/g.

Proteínas.

17 kJ o 4 kcal/g.

Lípidos(Grasas).

38 kJ o 9 kcal/g.

1.2. Cálculo de proteínas.

La cantidad de proteínas que se indique, debe calcularse utilizando la siguiente ecuación:

Proteína = Contenido total de nitrógeno determinado por Kjeldahl x 6,25.

1.3. Cálculos de nutrimentos.

Se deben calcular de conformidad con lo establecido en el apéndice normativo C de este ordenamiento, el cual figurará como se señala a continuación:

1.4. Cálculos de nutrimentos.

1.5. Cálculos de energía.

1.5.1. La cantidad de energía que se indique debe calcularse utilizando los siguientes factores de conversión:

Hidratos de carbono (carbohidratos).

17 kJ o 4 kcal/g.

Proteínas.

17 kJ o 4 kcal/g.

Lípidos(Grasas).

38 kJ o 9 kcal/g.

1.2. Cálculo de proteínas.

La cantidad de proteínas que se indique, debe calcularse utilizando la siguiente ecuación:

Proteína = Contenido total de nitrógeno determinado por Kjeldahl x 6,25.

1.3. Cálculo de vitaminas.

Vitamina A.

1 UI de vitamina A es equivalente a 0,3 µg equivalentes de retinol (all trans Retinol).

Vitamina D₃.

1UI de vitamina D₃ es equivalente a 0,025 µg de colecalciferol.