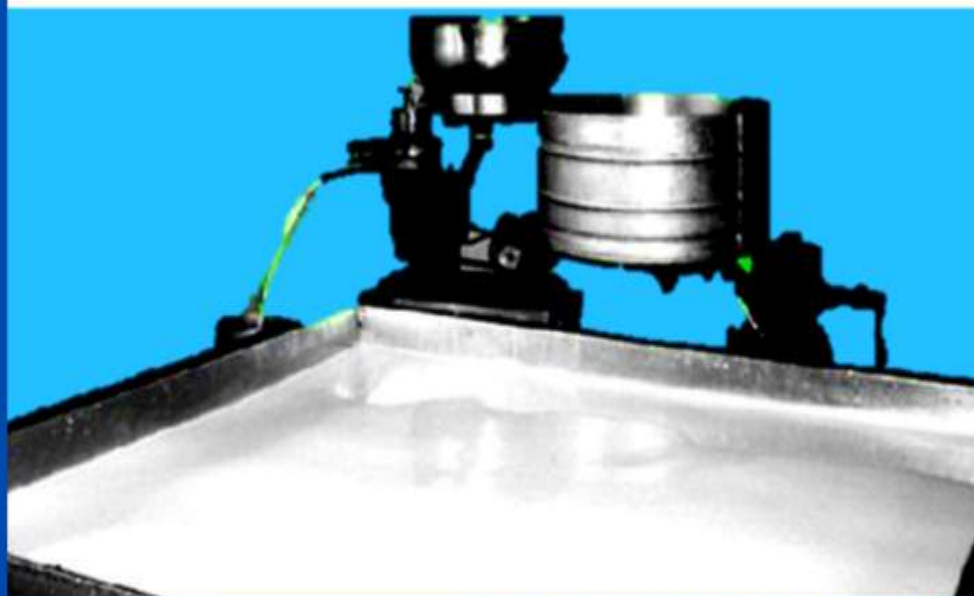


SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE BOVINA Y CAPRINA

ACTIVACIÓN Y USOS EN CONSERVACIÓN DE LECHE Y CONTROL DE ENFERMEDADES



HÉCTOR BRACHO ESPINOZA

SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE BOBINA Y CAPRINA

**ACTIVACIÓN Y USOS EN CONSERVACIÓN DE LECHE Y CONTROL DE
ENFERMEDADES**

2022. Autor:
Héctor Bracho Espinoza

Fondo Editorial UNEFM
Falcón – Venezuela

Decanato de Investigación UNEFM
Programa Ciencias Veterinarias UNEFM

CUARTA EDICIÓN

HECHO DEPÓSITO DE LEY
Depósito legal: FA2022000025
ISBN: 978-980-245-106-7

Versión digital:
Fondo Editorial UNEFM
Derechos reservados



Universidad Nacional
Experimental
Francisco de Miranda
UNEFM



SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE BOBINA Y CAPRINA

ACTIVACIÓN Y USOS EN CONSERVACIÓN DE LECHE Y CONTROL DE ENFERMEDADES

HÉCTOR BARACHO ESPINOZA

ÍNDICE

	PAG.
PRÓLOGO DE LA PRIMERA EDICIÓN.....	12
PRÓLOGO DE LA CUARTA EDICIÓN.....	16
I. CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA LACTOPEROXIDASA Y DEL TIOCIANATO EN LECHE BOVINA Y CAPRINA, COMO SUSTRATOS ACTIVADORES DEL SISTEMA (SLPO) EN LA CONSERVACIÓN DE LA LECHE CRUDA.....	19
INTRODUCCION.....	20
ASPECTOS TEÓRICOS.....	24
Características bioquímicas de la lactoperoxidasa.....	27
Aplicaciones tecnológicas.....	30
Importancia de la mastitis sobre la calidad de la leche.....	36
Despistaje de mastitis en el rebaño.....	37
MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS.....	39
Diagnóstico de Mastitis.....	39
Determinación de peroxidasa (Método cualitativo).....	39
Determinación cuantitativa de la peroxidasa en leche.....	40
Procedimiento.....	41

Fundamento del método.....	42
Elaboración de la curva estándar.....	43
Control de factores: Determinación de pH y temperatura.....	43
Determinación de acidez titulable.....	43
Determinación del Contenido de Tiocianato.....	44
Análisis microbiológicos de la leche sometida a conservación mediante activación del sistema LPO.....	44
Análisis Estadístico.....	45
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	72
RECOMENDACIONES.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78
II. VARIACIÓN DE LA ACIDEZ Y DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACTOPEROXIDASA (LPO) DE LA LECHE BOVINA, POR LA ADICIÓN DE ANTIMICROBIANOS.....	89
INTRODUCCIÓN.....	90
METODOLOGÍA.....	92
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	93

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
Adición de formaldehído.....	95
Adición de peróxido de hidrógeno.....	95
CONCLUSIONES.....	100
RECOMENDACIONES.....	105
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
III. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL PROCESO INFLAMATORIO DE LA UBRE (MASTITIS) DE CABRAS Y VACAS POR EFECTO DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA (SLPO) EN INFUSIÓN INTRAMAMRIA.....	111
INTRODUCCIÓN.....	113
ASPECTOS TEÓRICOS.....	117
La enzima lactoperoxidasa.....	118
El Tiocianato.....	119
El Peróxido de hidrógeno.....	119
El Sistema Lactoperoxidasa (SLPO).....	119
Aplicaciones tecnológicas.....	120
Características de la mastitis en vacas y cabras.....	121
Método de diagnóstico de la mastitis.....	121

Interpretación de la prueba California Mastitis Test (CMT).....	123
Tratamientos de la mastitis.....	126
MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
Ubicación geográfica del área de estudio.....	130
Características Agroecológicas.....	135
Población y muestra.....	135
Análisis Estadístico.....	135
Fase de campo.....	136
Recolección de muestra.....	137
Prueba California de Mastitis (CMT).....	137
Fase de laboratorio.....	137
Diagnóstico bacteriológico.....	138
Proceso de activación del sistema LPO.....	140
Determinación cuantitativa de la enzima LPO.....	141
Fórmula para la determinación del volumen de actividad de la LPO...	142
Determinación de tiocianato en leche.....	142
Activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO) en leche.....	143
Aplicación de la infusión intramamaria en cabras y vacas.....	144
Evaluación post aplicación de la infusión intramamaria en cabras y vacas.....	144

RESULTADOS.....	145
Comportamiento de la mastitis en cabras.....	146
DISCUSIÓN.....	153
Control de mastitis subclínica en cabras.....	153
Control de mastitis subclínica en vacas.....	155
CONCLUSIONES.....	157
RECOMENDACIONES.....	159
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	160
IV. CONTROL DE LA DIARREA COLIBACILAR EN LECHONES USANDO EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA ACTIVADO EN LECHE DE VACA.....	174
INTRODUCCIÓN.....	175
SISTEMA LACTOPEROXIDASA (SLPO).....	179
MATERIALES Y METODOS.....	182
Población en estudio y tamaño de la muestra.....	182
Fase de campo I.....	182
Fase de laboratorio I.....	183
Fase de Laboratorio II.....	183

Detección de la enzima peroxidasa (método cualitativo).....	184
Determinación cuantitativa de la peroxidasa en leche.....	184
Determinación cuantitativa del tiocianato.....	185
Activación del Sistema Lactoperoxidasa (SLPO).....	185
Conservación de la leche con el sistema LPO activado.....	186
Fase de Campo II.....	186
Análisis estadístico.....	187
RESULTADOS.....	190
DISCUSIÓN.....	204
CONCLUSIONES.....	207
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	209

PRÓLOGO DE LA PRIMERA EDICIÓN

Ciencia y Tecnología de la Leche es una Unidad Curricular perteneciente al eje de Producción e Industria Animal del Programa Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda” (UNEFM).

El propósito es presentar algunos componentes de esta Unidad Curricular en forma breve en lo que respecta a Ciencia y Tecnología de la Leche es decir, composición y características de la leche cruda, tratando de acercarla a las actividades que se ejecutan diariamente en el circuito agroalimentario leche en el estado Falcón y, su relación con la calidad de la misma como materia prima a ser sometida a procesos de transformación, para generar productos y subproductos lácteos.

Se pretende aportar información de la composición físico-química y microbiológica de la leche, con especial énfasis en las especies bovina y caprina, donde el contingente de estudiantes que han pasado a lo largo de más de veinte años en las asignaturas: Tecnología de la Leche y sus Derivados, Higiene y Control de Calidad de Alimentos, Producción Pecuaria II y Trabajo Especial de Grado, de los programas Ciencias Veterinarias, Ingeniería Agronómica e Ingeniería

Química ha permitido relacionar conocimientos y conectarlos con la situación del Programa de Higiene de la Leche en el estado Falcón, facilitando hacer aportes para el mejoramiento de la producción de leche en los diferentes municipios, garantizando la calidad de la materia prima en función de los productos y subproductos lácteos a los cuales se destina la leche cruda.

Se hizo énfasis en aquellas características y factores que permiten apreciar rápidamente ciertos cambios de la composición físico-química y microbiológica, que infieren la presentación de productos y subproductos lácteos sanos, de calidad uniforme y que respondan siempre a la calidad establecida en las Disposiciones o Normativas Legales vigentes, emanadas del Gobierno Nacional, así como también, de la Empresa Láctea Nacional organizada en sus diferentes Cámaras inherentes a la producción industrial.

Se trató de enfocar los diferentes problemas que confronta la producción láctea nacional, pensando siempre en las condiciones de país tropical, sin embargo, no se han incluido todos los grupos de productos alimenticios conocidos que se derivan de la leche, materia prima versátil en la generación de productos y subproductos lácteos. Se ofrecen los valores paramétricos y se mencionan los métodos oficiales

establecidos en la Resolución sobre Leche y Derivados vigente desde el año 1959, modificada sólo en el literal que atiende a la adición y substracción de componentes para permitir al CENSA de Cuba, a través de un Convenio de Cooperación cubano-venezolano, el uso del STABILAK (activador enzimático), durante los años 2000-2002, así como también, en las recomendaciones oficiales del gobierno trazadas en las Normas COVENIN, mantenidas en permanente revisión; adecuando siempre tanto las determinaciones, como los métodos descritos, a la capacidad del laboratorio industrial y a los criterios institucionales.

El contacto con las industrias y experiencias propias nos hace suponer que esta modesta publicación, será bien acogida por los técnicos ocupados en actividades industriales, tanto en el control de calidad e investigación, como en la producción.

El Sistema LPO (Lactoperoxidasa-peróxido de hidrógeno-tiocianato de potasio), es capaz de conservar la leche cruda a temperatura ambiente, sin modificar sus parámetros de calidad y valor nutritivo y representa una alternativa importante para preservar grandes volúmenes de leche que se producen en fincas sin infraestructura de refrigeración (falta de energía eléctrica), en pésimas condiciones de vialidad agrícola, muy distantes de las zonas de acopio o procesamiento y en difíciles condiciones climáticas por efecto de las temperaturas

tropicales. El uso apropiado del Sistema LPO en la preservación de la leche cruda y de los productos lácteos no plantea riesgos para la salud humana y puede ayudar a mejorar la producción láctea en Venezuela.

Es propósito futuro ampliar la presente publicación en próximas ediciones, y agradezco las observaciones y críticas constructivas que lectores competentes hagan. También agradezco a los colegas profesores: Julio, López Pérez (UNEFM-LUZ); Merlín, Colmenares-Pulgar; Ingrid Holmsquist UNEFM; Héctor García IUTAG; Nancy López y Aura Scaramelli UCV por la lectura y evaluación de manuscritos, cuando se desempeñaron como jurados de trabajos de ascenso.

Agradezco al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), a la Fundación para el Desarrollo Científico y Tecnológico del estado Falcón (FUNDACITE-FALCÓN) y al Consejo de Investigación de la UNEFM por el financiamiento parcial de estas investigaciones.

El Autor.
Santa Ana de Coro, 2010

PRÓLOGO DE LA CUARTA EDICIÓN

Fue un propósito a futuro establecido en la primera edición, continuar publicando información sobre el sistema LPO, (peroxidasa/peróxido de hidrógeno/tiocianato), mecanismo enzimático capaz de conservar la leche cruda a temperatura ambiente manteniendo sus parámetros de calidad y valor nutritivo. Constituye una alternativa importante para preservar grandes volúmenes de leche que se producen en fincas con difíciles condiciones climáticas por efecto de las temperaturas tropicales, sin infraestructura de refrigeración, con vialidad agrícola deficiente y muy distante de los centros de acopio o procesamiento.

El uso apropiado del Sistema LPO en la preservación de la leche cruda y de los productos lácteos no plantea riesgos para la salud humana y puede ayudar a mejorar la producción láctea en Venezuela en lo que respecta al manejo de la leche cruda como materia prima para la industria, incrementándose la producción de leche de calidad a partir de vacas, cabras y búfalas; así mismo, por sus bondades como bactericida y bacteriostático puede ejercer control sobre la mastitis, enfermedad inflamatoria de la ubre de los mamíferos, generadora de pérdidas económicas.

Otra bondad del uso de del Sistema LPO es que puede coadyuvar en el fortalecimiento del sistema de producción agrícola animal al impactar la producción de carne de cerdos mediante la superación de la mortalidad de lechones a causa de la diarrea colibacilar, una vez que ejerce control sobre la bacteria que la causa.

Se ha querido conservar el carácter práctico en el tratamiento de la información, dando oportunidad para que el lector tenga una información más amplia sobre los temas tratados, por lo cual se ha organizado en capítulos cuidadosamente revisados, aportando al final de cada tema referencias bibliográficas seleccionadas.

Se reitera el agradecimiento a todos los colegas profesores de la Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda (UNEFM), Universidad Central de Venezuela (UCV) y del Instituto Universitario de Tecnología “Alonzo Gamero” (IUTAG), por la revisión y evaluación de los manuscritos y sus recomendaciones, cuando se desempeñaron como jurados de trabajo de ascenso y defensa de trabajo de maestría del autor.

También agradezco al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), a la Fundación para el Desarrollo

Científico y Tecnológico del estado Falcón (FUNDACITE-FALCÓN) y al Consejo de Investigación de la UNEFM por el financiamiento parcial de estas investigaciones.

El autor

I

**CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA LACTOPEROXIDASA Y
DEL TIOCIANATO EN LECHE BOVINA Y CAPRINA, COMO
SUSTRATOS ACTIVADORES DEL SISTEMA (SLPO) EN LA
CONSERVACIÓN DE LA LECHE CRUDA**

INTRODUCCION

La enzima lactoperoxidasa, así como sus agentes activadores peróxido de hidrógeno y Tiocianato de potasio forman parte integral de la propia leche, no afectan las propiedades organolépticas de la misma y por ende la de sus derivados, descartándose la opinión de la aparición de sustancias extrañas. La activación del Sistema Enzimático LPO, genera una acción bactericida y bacteriostática que actúan sobre los mecanismos contaminantes de la leche, retardando la acidificación y el efecto perjudicial de las bacterias presentes y su proliferación (Korhonen), 1980; Zajac, 1993; Ponce, *et. al.*, 1994; Stefano *et. al.*, 1997; Haddadin, 1997).

El sistema lactoperoxidasa-peróxido de hidrógeno-tiocianato contiene inhibidores naturales en la leche (también es muy activo en la saliva) y se usa para mantener la calidad de leche cruda entera entre 8 y 16 horas post-ordeño a una temperatura entre 20 y 34°C, además, asociada a temperatura de refrigeración se conserva por mayor tiempo sin alterarse sus cualidades originales (Aparicio, *et. al.*, 1986; I.D.F, 1988; Bracho, 1994; Haddadin, 1997).

Este procedimiento para lograr mantener la calidad de la leche cruda entera mediante la activación del sistema lactoperoxidasa, fue aprobado en la 35^{va} Reunión de la Organización Mundial de la Salud. Informe Técnico No. 789 de 1990 y recomendado por el Comité Mixto de la Food and Agriculture Organization (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), de expertos gubernamentales sobre el código de principios referente a la leche y los productos lácteos (documento CX5-70 vigésimo segundo período de sesiones. Párrafo 69-72 (Pütter, 1974; Aimuti y Eigel, 1982; Perraudin, 1991; FAO/OMS, 1991; Ponce, *et. al.*, 1994; Gaya, *et. al.*, 1997).

Grandes volúmenes de producción de leche obtenida en las unidades de producción sin infraestructura de refrigeración, con medios de transporte tradicionales, por vías inadecuadas y de difícil acceso, recorrido de grandes distancias desde el sitio de producción a las plantas procesadoras y en condiciones climáticas desfavorables para la conservación, inhibidores diversos, desconociendo sus riesgos de toxicidad; son situaciones para las cuales el sistema LPO representa una alternativa (Bracho, 1994; Bracho 2004).

Las estrategias metodológicas para desarrollar esta investigación se diseñaron mediante un Programa de

Investigación de avances sucesivos cuyos objetivos específicos se fueron cumpliendo a través de proyectos cortos que permitieron ir completando la información básica que demostró el comportamiento de la actividad enzimática de la enzima lactoperoxidasa (LPO), así como sus mecanismos de activación en leche bovina y caprina y, hoy permiten interpretar que luego del conocimiento de la concentración de la LPO y de tiocianato en la leche, cuales concentraciones de sustrato hacen más efectivo la activación del sistema enzimático y su acción bactericida y bacteriostática en el alargamiento de la vida útil de la leche.

Este programa de investigación evidenció cuantitativamente la actividad de la enzima Lactoperoxidasa (LPO) de la leche de vacas y cabras mestizas en diferentes lactancias y períodos de lactancia, alteraciones patológicas de la ubre (mastitis), durante el envejecimiento de la leche y por la adición de aditivos antimicrobianos: Formaldehído, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bracho 1999), tiocianato de potasio (SCN) a fin de establecer las variaciones que experimenta la concentración de la enzima LPO en la leche bovina y caprina.

Con esta información podremos ensayar la activación del sistema enzimático LPO, como un mecanismo para preservar leche en ausencia de refrigeración y resolver el problema de

enfriamiento de la leche en las zonas de producción del estado Falcón donde existen realmente dificultades para el manejo de la leche cruda.

ASPECTOS TEÓRICOS

En la mayoría de países subdesarrollados se confrontan graves problemas para mantener la cadena de frío de la leche, ocasionando pérdida de la calidad debido al deterioro de sus características físico-químicas y microbiológica; lo cual a su vez genera problemas de procesamiento a nivel de la industria, pérdidas económicas y en última instancia abandono de la actividad productiva. Venezuela no escapa a esta realidad, numerosos estudios así lo confirman.

En el estado Falcón, por ejemplo, se ha determinado la calidad físico-química y bacteriológica de la leche cruda producida en diferentes municipios (Boscan, 1973; Bracho, 1989; CIEPE, 1992). En términos generales estos autores concluyen que la leche producida se encuentra dentro de los parámetros establecidos en las normativas vigentes para leche cruda en lo referente a su calidad fisicoquímica pero, en el caso de su carga microbiana, se ubica en la categoría “sin clasificación”. Un factor que contribuye a la mala calidad microbiológica de la leche es la alta incidencia de mastitis subclínica en los rebaños lecheros. Así lo comprueban ICMSF, 1983; Scaramelli, 1988.

El efecto de la mala calidad de la leche se hace extensivo a los productos que con ella elaboran (Bracho 1992). En el caso del queso, Petit (1992) detectó un elevado promedio de coliformes totales, fecales y mesófilos aerobios, así como también, un elevado porcentaje de contaminación por *Staphylococcus* sp; concluyendo ambos autores que la leche cruda no cumple con los requisitos de calidad exigidos por las normas COVENIN. 903-1993.

En definitiva se puede observar que desde su producción a nivel de fincas hasta su venta (circuito lácteo) existe un deterioro gradual de la leche y de los principales productos y subproductos lácteos, que ameritan la implementación de estrategias para preservar la calidad de la leche. Alfa Laval Food, 1990; Alais, 1991; Bracho, 1994; Bracho, 1997; Bennet, 1999.

La lactoperoxidasa es una enzima muy abundante en la leche de vaca, se encuentra en una concentración bajísima en la leche humana. Su estructura orgánica (Figura 1), contiene una molécula de hierro activado formando parte de un sistema defensivo relativamente complejo que permite la formación en la propia leche de sustancias con gran poder antimicrobiano. El uso del sistema lactoperoxidasa (LPO) como un mecanismo de protección de la ubre es un método alternativo para la

evolución de la mastitis sub-clínica. La activación del sistema LPO, genera una acción bactericida y bacteriostática que actúa sobre los agentes contaminantes de la leche.

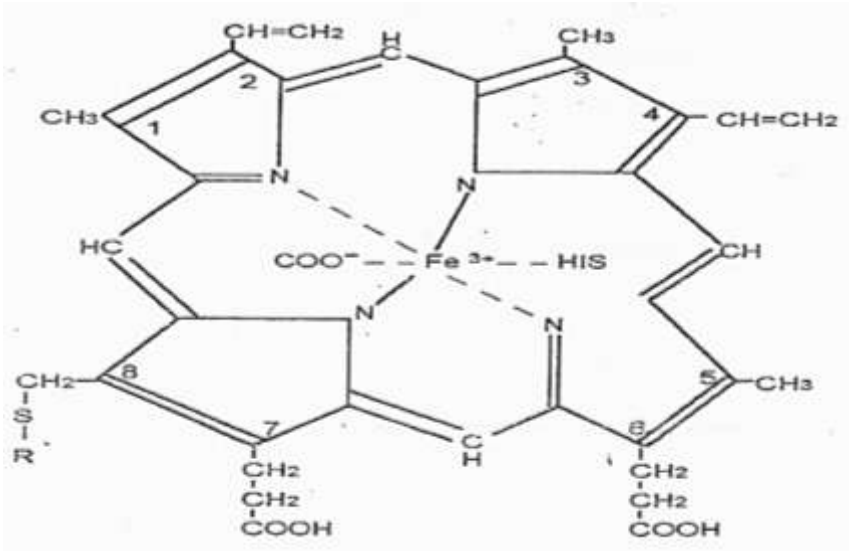


Figura 1 Estructura de la Lactoperoxidasa Hemo.(Pütter,1974)

Al sistema lactoperoxidasa se le atribuye la protección de la glándula mamaria de vacas, cabras y búfalas al inhibir varias bacterias Gram positivas y Gram negativas causantes de mastitis. Se ha demostrado que la enzima lactoperoxidasa y sus sustratos activadores peróxido de hidrógeno y tiocianato no representan peligro para la salud humana, siempre que se use en concentraciones establecidas en las normas internacionales (FAO, 1990).

Características bioquímicas de la lactoperoxidasa

En condiciones normales la leche contiene una gran cantidad de enzimas con sustancias orgánicas de naturaleza proteica, producida por células y organismos vivos que actúan como catalizadores de las reacciones bioquímicas (Goursaud, 1991). Este mismo autor indica que Arnold en 1981 menciona la presencia de lactoperoxidasa en la leche de vaca siendo muy probable que fuera la primera enzima descubierta en la leche.

La lactoperoxidasa (LPO) es una enzima perteneciente al grupo de los oxidorreductasas, es responsable de la fase bactericida y bacteriostática presente en la leche durante las primeras horas que siguen al ordeño. La lactoperoxidasa es una proteína de origen endógeno presente en la leche de todos los mamíferos, es sintetizada en la glándula mamaria o pasa vía sanguínea hasta el epitelio mamario y luego es secretada en la leche (Corbin y Whittier 1965, Brunner, 1970; Aimutis y Eigel, 1982, Bracho 1994).

La lactoperoxidasa es una proteína de la leche con actividades biológicas especiales y, particularmente, las que son eficaces contra los microorganismos pueden permitir el desarrollo de nuevos productos en campos como la alimentación infantil, la ganadería, la cosmética o la industria

farmacéutica. Por otra parte, algunas de estas proteínas incluso solo con las aplicaciones actuales tienen ya un cierto valor económico como la lactoferrina y la lactoperoxidasa que ya son comercializadas por algunas empresas (Calvo *et al* 2000).

El ion tiocianato (SCN^-) es un componente natural de la leche que forma parte del sistema denominado lactoperoxidasa/Tiocianato/peróxido de hidrógeno ($\text{LPO}/\text{SCN}^-/\text{H}_2\text{O}_2$), cuya función es la de activar el sistema de defensa natural de la leche y por ende provee a la leche un mecanismo de protección que previene su acidificación. El tiocianato al ser oxidado por la enzima lactoperoxidasa origina un producto de intercambio que es denominado ion hipotiocianato el cual es un potente destructor de bacterias (Mullan *et al.*, 1980).

El ion tiocianato (SCN^-) es un anión que se encuentra en los tejidos animales y sus niveles se relacionan con la dieta y hábitos de vida. Es un componente natural de la leche que forma parte del sistema lactoperoxidasa ($\text{LPO}/\text{SCN}^-/\text{H}_2\text{O}_2$), cuya función es la de activar el sistema de defensa natural de la leche y por ende la provee de un mecanismo de protección que previene su acidificación (Mullan *et al* 1980).

El sistema SLPO está compuesto por la enzima lactoperoxidasa en concentraciones de 30 g/mol de leche, tiocianato a 0.02 – 0.025 mg/1 y peróxido de hidrógeno 0.4 nM cuyas fuentes en la leche puede ser por vía enzimática mediante el sistema glucosa/glucosa oxidasa, por acción microbiana de lactobacilos en el abomaso y por adicción directa (Mullan, *et al.*, 1980), se habla de actividad específica de la enzima cuando ésta es expresada por número de unidades de enzima por mg. de proteína.

La lactoperoxidasa es de las enzimas más termoestables de la leche, ésta ha contribuido a que se use como indicadora de tratamiento térmico. Si una muestra de la leche pasteurizada no contiene lactoperoxidasa, significa que ha sido calentada por encima de 77,8°C, es decir que ha ocurrido un sobrecalentamiento (Rodríguez y Martin, 1980).

El tiocianato se acumula en la leche y es originado de la reacción catalizada de la rodhanasa con tiosulfato en el hígado, riñones y tiroides o de la hidrólisis de los glucósidos que ocurren en las Brassicaceae, en la Raphanies y en otras plantas. El tercer componente, el (H₂O₂) es producido metabólicamente por el *Streptococos*, por ello los *Streptococos* son “auto inhibidores” en el sistema SLPO; la enzima se combina con (H₂O₂) para oxidar SCN y dar origen a

un producto intermedio de la oxidación que es el hipotiocianato el cual, es inhibidor de microorganismos en la leche (Reiter, 1978).

El tiocianato de sodio es un componente natural de la leche cuya función es la de actuar como inductores de la actividad enzimática y, al producir iones de tiocianato reaccionan con componentes específicos de la pared celular de los microorganismos, produciendo una acción bactericida o bacteriostática, dependiendo de las características de estos (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Habana, Cuba, 1990).

Aplicaciones tecnológicas

La enzima lactoperoxidasa constituye junto con iones de tiocianato y peróxido de hidrógeno el sistema lactoperoxidasa (SLPO), el cual tiene papel bactericida y/o bacteriostáticos en el control de bacterias patógenas, control de bacterias psicrótrofas y mesófilas putrefactivos, inactivación de toxinas microbianas y potenciación de la destrucción térmica de bacterias; en conjunto el sistema LPO representa una tecnología capaz de proteger a la leche cruda de su flora deterioradora por largos periodos de tiempo, para asegurar su manipulación higiénica en los trópicos (Aparicio *et. al.*, 1986).

La lactoperoxidasa forma parte de un sistema defensivo relativamente complejo que permite la formación en la propia leche, o en el tubo digestivo, de sustancias con gran poder antimicrobiano. La lactoperoxidasa cataliza la formación de estas sustancias en presencia de trazas de agua oxigenada. Esta agua oxigenada es a su vez formada por la acción de otras enzimas o incluso por los propios microorganismos que luego sufrirán los efectos de los productos formados por la lactoperoxidasa. La lactoferrina y lactoperoxidasa se pueden aislar del lactosuero de quesería para su aplicación como “conservante natural” de algunos productos alimenticios como el queso fresco (Calvo *et al.*, 2000).

La activación del sistema lactoperoxidasa tiene un efecto bacteriostático sobre la leche cruda extendiendo la vida del producto por 7 – 8 horas bajo condiciones tropicales. Esto significa que los productores pueden transportar la leche desde el punto de acopio hasta la planta procesadora, incrementando significativamente el ingreso generado en la finca o en el grupo de productos (Bennet, 1999).

El sistema lactoperoxidasa resultó ser bacteriostático contra los microorganismos mesófilos aerobios , coliformes totales y *Staphylococcus* spp a las 24 y 48 horas a temperatura ambiente en las diferentes concentraciones de peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) y tóxicano (SCN^-) utilizadas para las muestras que se encontraban en condiciones de refrigeración, el sistema lactoperoxidasa LPO actuó como bacteriostático durante las 24, 48 y 72 horas en todas las concentraciones de H_2O_2 y SCN^- manteniendo una acidez promedio de 17 ml NaOH al 0,1 N.(Bracho, 2010).

Se ha demostrado que la lactoperoxidasa y sus sustratos activadores no representan peligro para la salud humana siempre que se use en concentraciones establecidas en las normas internacionales (Kamau y Pruitt, 1991). Además Kamau y Pruitt en (1991), indicaron que el sistema LPO se le atribuye la protección de la glándula mamaria de vacas no lactantes frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* además adicionándoles H_2O_2 y SCN^- in vitro a la leche bovina, suero de leche o medio de crecimiento que contenga LPO, se inhibe varias bacterias causantes de mastitis, las cuales son patógenos humanos y pueden ser difundidas en leche de vaca con ubres infectas. Así como indican que el sistema LPO es también inhibidor de enterobacterias causantes de gastroenteritis asociadas con la alta mortalidad infantil especialmente en países de desarrollo.

Reiter (1985) explicó que el sistema LPO puede proveer un mecanismo de defensa in vitro contra infecciones de la ubre en

la vaca y proteger contra la gastroenteritis de lo cual se ha tenido evidencias en becerros recién nacidos.

El sistema tiocianato – peróxido de hidrógeno – enzima lactoperoxidasa consiste en la oxidación de iones de tiocianato, por la acción de la enzima lactoperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno y la consecuente acción de los iones oxidados sobre las bacterias presentes en la leche, retardando su deterioro entre 8 a 16 horas, haciéndolo depender de la temperatura ambiente la calidad inicial de la leche y la presencia de pequeñas cantidades equimolares de tiocianato y peróxido mejora la acción del sistema que constituye en mecanismo de defensa natural del organismo humano. Sus componentes aparecen en altas concentraciones en la saliva, jugo gástrico y en la propia glándula mamaria, por lo cual se considera que su activación no representa ningún riesgo para las personas que consumen la leche tratada con este método (FAO-OMS, 1981).

El sistema lactoperoxidasa es bacteriostático contra: *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, y *Campylobacter jejuni*, microorganismos patógenos que pueden estar en la leche (Kamau, *et. al.*, 1991). En África las largas distancias, la falta de infraestructura y el duro clima, afectan drásticamente la calidad y la cantidad de la

leche producida por el pequeño productor lechero sudafricano. Prinsloo *et al.*, 1999.

La activación del sistema LPO usando como sustratos donadores de electrones: el peróxido de hidrógeno y el tiocianato, es una alternativa válida en países tropicales para preservar la leche cruda especialmente en muchas áreas productoras de Venezuela donde se carece de sistema de refrigeración (Bracho, 1997).

Jogo y Morrison, citados por Kamau y Pruitt, (1991) introducen el papel del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el SLPO, al observar que las altas concentraciones de catalasa eran contrarias a la actividad de la leche. Por otra parte, estos mismos autores indican en 1963, cuando Reiter y colaboradores reportaron que el tiocianato (SNC) fue requerido para la activación del Sistema Lactoperoxidasa (SLPO) en bovinos; con lo que esclarecieron las propiedades del sistema LPO. El valor de la actividad de la lactoperoxidasa en la leche es de 22.000 UI con una desviación estándar de 1.612 UI (Whitaker, 1972).

La LPO con iones de tiocianato y peróxido de hidrógeno constituyen el Sistema lactoperoxidasa – tiocianato – peróxido de hidrógeno. Para activar este sistema se requiere

adecuadas concentraciones de estos tres componentes. La lactoperoxidasa puede ser suplida de algunas fuentes exógenas y se ha sugerido que 0,4 mM de H₂O₂ es la concentración necesaria para la activación del SLPO. La bacteriostasis prolongada causada por la acción de este sistema es dependiente de los niveles de contaminación. Por encima de un nivel de 10⁴ ufc/ml, por 6 horas, en las muestras de leche con el sistema SLPO activado, ocurren variaciones de pH, más lentamente resultando en una mejor conservación de su calidad (Mijacevic *et al.*, 1989).

El tiocianato es activador del sistema lactoperoxidasa, generando con ello acción bactericida y bacteriostática que actúa sobre los microorganismos contaminantes de la leche, retardando la acidificación y el efecto perjudicial de las bacterias presentes en la misma e impidiendo su proliferación; lo cual permite mantener la calidad de la leche cruda entre 8 y 16 horas consecutivas después del ordeño a temperatura ambiente entre 20 y 34°C (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Habana, Cuba 1990).

Las enzimas lácticas son factores de degradación de los componentes originales de la leche, por lo tanto pueden inducir modificaciones en el plano tecnológico (pérdida de rendimiento) y sobre las propiedades organolépticas de los

productos transformados (modificación de la textura, mal sabor, etc.) en ésta categoría se encuentran las lipasas y las proteasas (Goursaud, 1991; Alais y Blanc, 1985).

El sistema LPO y la enzima lactoperoxidasa generan confianza por la activación de mecanismo que inhiben contaminación microbiana o presencia de microorganismo patógenos y sus toxinas, lo cual pueden mejorar la calidad de la leche cruda durante su manipulación en las fincas, así como también , en el transporte a las plantas procesadoras, ya que el periodo de multiplicación de las bacterias inhibidoras se prolonga a temperatura ambiente (Bjorck y Glaesson, 1978); Codex Alimentarius, 1988; Kamau *et al.*, 1990; Bracho, 1994).

Importancia de la mastitis sobre la calidad de la leche

La mastitis es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria, donde se asocian una gran cantidad de agentes causales, se manifiesta en forma clínica o subclínica, siendo ésta última particularmente peligrosa por no ser evidente y disminuir la producción originando problemas económicos, así como, alterar la calidad de la leche. En este proceso inflamatorio de la ubre se produce ciertos incrementos en los niveles de sales en la leche originando una disminución de la resistencia eléctrica como también, se incrementan los contajes de células inflamatorias en la leche. Al producirse

desajustes en el equilibrio salino en el proceso fisiológico de secreción de leche de la glándula mamaria, puede afectarse la acidez y el pH, factores que modifican la estabilidad de la enzima lactoperoxidasa (Bracho, 2013).

Despistaje de mastitis en el rebaño

Se requiere conocer previamente la situación del rebaño en cuanto a prevalencia de mastitis mediante un despistaje, como una vía de asegurar la salud de la glándula mamaria. Generalmente se recurre a la aplicación de pruebas diagnósticas indirectas basadas en la estimación del contenido de células somáticas y la medida de conductibilidad eléctrica o la prueba del Tiempo de Reducción del Azul de metileno (TRAM), entre otras (Jiménez *et al.*, 2016).

La mastitis subclínica es una de las principales enfermedades que afectan a todas aquellas fincas dedicadas a la producción de leche en mundo, puede ocasionar grandes pérdidas económicas a los productores, fundamentalmente, si consideramos que constituyen la principal fuente de infección para los animales sanos, lo que se traduce en el incremento de prevalencia, a causa de la ausencia de signos evidentes que alertan al productor ante la presencia de esta enfermedad, permitiéndole la aplicación de un tratamiento temprano y la mejora las condiciones higiénicas sanitarias del ordeño,

recolección y transporte de la leche cruda a nivel de la unidad de producción (Bracho, 2013), (Jiménez *et al.*, 2016). Un 70 a 80% de las pérdidas económicas provocadas por la mastitis son atribuibles a la forma subclínica, por ser mucho más frecuente que la clínica (Blosser, 1979).

Los estudios de la frecuencia de mastitis, independientemente de la causa, muestran cifras comparables con una morbilidad cerca de un 45 % en vacas lecheras y una tasa de infección de la ubre de cerca de un 25% en promedio; un cuarto glandular afectado experimenta un 30% de disminución en su productividad y una vaca afectada pierde un 15% de su productividad, afectando también la calidad de la leche (Blood, *et al*, 1988).

La influencia de la mastitis sobre la composición de la leche sugiere medidas preventivas. La producción de leche de alta calidad y de un alto patrón de higiene depende de un sistema de manejo donde la calidad es producto de la seguridad del mismo (Heeschen, 1995). La buena práctica higiénica simple y efectiva, influirá positivamente en la calidad microbiológica de la leche cruda. Requerimiento importante cuando hablamos de preservación de la vida útil de la leche a través de su sistema de defensa natural como lo es la enzima lactoperoxidasa (Bracho, 2013).

La pezonera de la ordeñadora es una gran fuente de contaminación, mientras que con el ordeño manual se obtiene a menudo un producto de un nivel microbiológico superior, siempre que el animal y el ordeñador estén sanos. El área de ordeño tiene que estar en lo posible libre de excrementos. Se recomienda el lavado de la ubre y el secado con una toalla de papel (Prinsloo *et al.*, 1999).

MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

Diagnóstico de Mastitis:

-Se realizó diagnóstico de mastitis (despistaje de mastitis) en todos los animales en producción del rebaño mediante la prueba California Mastitis Test (CMT) y cultivo bacteriológico.

Determinación de peroxidasa (Método cualitativo).

-En esta detección se usó solución de guayacol al 10% en acetona (preparada 2-3 días antes de su empleo)

-Se colocó con una pipeta 10 ml de la muestra preparada en un tubo de ensayo.

-Se le adicionó 2 o 3 gotas de solución de H₂O₂ al 3%

-Luego se le colocó 8 gotas de solución de guayacol al 10% por las paredes.

-La formación de una banda color rojizo en la zona de contacto, fue el indicativo de la presencia de peroxidasa (ensayo de Arnold) (Vargas y López, 1979).

Determinación cuantitativa de la peroxidasa en leche

-Se utilizó el método de Johann Pütter (1974), en el cual se usó un Buffer fosfato (0.1 m, pH 7) compuesto de fosfato de potasio monobásico (HM_2PO_4) y dibásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), además solución de guayacol (20.1 mM) y solución de peróxido de hidrógeno (12.3 mM).

-Se introdujo en una cubeta: 3 ml de Buffer fosfato (0.1M); 0.05 ml de solución de guayacol (0.3 mM), 0.10 ml de muestra de leche y 0.03 ml de solución de peróxido de hidrógeno (0.1mM).

-Se agitó y dejó reaccionar dos minutos a 25°C (Linden et al, 1982).

-Se leyó la extinción de la solución en el espectrofotómetro a 436 nm de longitud de onda.

Procedimiento:

-Se diluyó 20 ml de leche con 20 ml de agua en un balón de 50 ml, se calentó a 37 °C, agregándole 2 ml de ácido acético al 10% y agitando, después de 10 minutos se le agregó 2 ml de acetato de sodio 1N, se dejó enfriar y enrasar, filtrar.

-Se tomó 5 ml de filtrado, se colocó en un balón de 50ml y enrasando con tampón de fosfato.

-Se colocó en un tubo de espectrofotómetro 0,3 ml de la solución anterior, 0,25 ml de reactivo de Rothenfusser, 0,05 ml al 1% de H₂O₂.

-Se agitó y leyó 540 nm después de 60 segundos de mezclado los reactivos. Blanco - 3ml de H₂O destilada más los reactivos.

El volumen de actividad enzimática se obtiene sustituyendo los valores de absorbancia obtenidos en la siguiente relación matemática:

$$\text{VAE} = \frac{V \cdot \Delta E \cdot 1000}{E \cdot d \cdot \Delta T \cdot 0,100}$$

Dónde:

V=Volumen de solución en la celda del Spectronic

ΔE = Cambio de densidad óptica medido (absorbancia)

E = Coeficiente de extinción del Guayacol (435nm.=6,39cm² / μ mol)

D = Distancia de 1cm. (paso de luz en la cubeta).

ΔT = Tiempo requerido para la reacción dos (2) minutos.

0,100 = Coeficiente de incremento de extinción.

1000 = Conversión a litro.

El resultado se expresa en unidades enzimáticas por ml de leche.

Fundamento del método

Las enzimas se determinan en base a la actividad con relación al volumen o al peso (Actividad relativa). La actividad enzimática es típicamente medida bajo condiciones específicas controladas, sobre un período específico de tiempo. Así la actividad puede ser evaluada mediante: a) monitoreo de la desaparición del sustrato. b) monitoreando la aparición del producto de deshidrogenación del guayacol (GDPH) en un período de tiempo de dos (2) minutos.

En este caso se usó un método de punto final basado en la determinación espectrofotométrica del producto deshidrogenación del Guayacol (GDPH) Pütter, 1974.

Elaboración de la curva estándar

- Solución madre (en agua destilada): 0.1 mg de lactoperoxidasa por ml.

-Se prepararon estándares (en leche estéril) conteniendo 1- 2,5 5- 10- 15- 20 mg de lactoperoxidasa por litro de leche. Para ello agregar a cada porción de 20ml de leche 0.2 – 0.5, - 1.0 – 2.0 – 3.0 de la solución madre.

-Estos estándares se trataron como la leche para la determinación de peroxidasa.

-Se construyó la curva de densidad óptica en función de la concentración.

Control de factores: Determinación de pH y temperatura.

Se realizaron lecturas de pH y temperatura en las muestras de leche usando pH-metro Corning 240 con piloto de temperatura incorporado.

Determinación de acidez titulable.

Método Oficial AOAC VI Edición 1945. Normas para el examen de productos lácteos. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud No. 84, 1973. Vargas y López 1979.

Determinación del Contenido de Tiocianato.

El contenido de Tiocianato en leche cruda se estimó mediante los procedimientos establecidos en el método de Bowler (1984).

Análisis microbiológicos de la leche sometida a conservación mediante activación del sistema LPO.

-Se realizó la preparación de dilución de la muestra objeto de análisis mediante método standard. Methods of the examination of dairy products (APHA), 1960.

- Se enumeraron los gérmenes mesófilos aerobios. Método Standard de recuento en placa por siembra en profundidad. Recomendado para productos lácteos APHA 1960. Lewis y Angelotti, 1964; García, 1987; Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN) N° 902-1982.

-El recuento de coliformes totales y fecales, por el método COVENIN N° 1104-1984 y técnicas del NPM. Número más probable.

-Determinación de *Escherichia coli*. Método COVENIN N° 1104-1984.

-Determinación de *Staphylococcus aureus*. Método COVENIN N° 1292-1982.

Análisis Estadístico.

-Para estudiar el efecto del número de lactancias y periodos de lactancia sobre la variable actividad enzimática de la (LPO) en muestras de leche de los cuatro cuartos de la ubre de vacas y de los dos cuartos de la ubre de cabras, se usó el Análisis Multivariado de Varianzas, Análisis de Perfiles, en virtud de que este ensayo se diseña en mediciones repetidas sobre una misma unidad experimental (vacas o cabras) y, cada medición puede resultar en una variable aleatoria con distribución de probabilidades multivariada (Morrison, 1977). Se usó el sistema estadístico SAS-STAT (1985).

-Para la evaluación del efecto de los procesos inflamatorios de la ubre (mastitis) sobre la actividad enzimática de la LPO se estableció la mediana del valor de actividad enzimática y se separaron dos grupos independientes sanos y enfermos, para aplicar estadística no paramétrica Kruskal-Wallis (aproximación chiquadrado), a fin de conocer la independencia de la variable en estudio (Conover, 1977) Se usó SAS-STAT 1985.

-Todos los demás efectos estudiados se sometieron a un estricto análisis estadístico sistematizado, de manera de obtener la información más fidedigna que se pueda extraer de los datos, con la finalidad de llegar a conclusiones que permitan tomar decisiones en el avance de los objetivos específicos que se trazaron. Además

del uso del sistema estadístico SAS-STAT, 1985; se usó el paquete estadístico STATISTIX 4.0 1985-1992.

RESULTADOS

Se determinó en la leche de vacas en primera, segunda y tercera lactancia durante un período de seis (06) meses, las variables: volumen de actividad enzimática y acidez, para estudiar su variación en función de estas etapas fisiológicas las cuales se representan en las Tablas 1y 2.

Tabla 1. Análisis multivariado de varianzas de la variable actividad enzimática U/l de muestras de leche vacas en primera, segunda y tercera lactancias durante un período de seis meses.

Actividad enzimática (Unidades/l)			
Fuente Equivalente	GL	Estad. Multivariado.	F.
	P>F		
Período Lact. / 0,5496 ns	10	Wilk's 0,6249	0,9010
Lactancia 0,2707 ns		Roy's 0,3893	1,4014
Período de 0,2692 ns	5	Wilk's 0,7065	1,4127
Lactancia 0,2695 ns		Roy's 0,4155	1,4127

ANOVA SS

Lactancia	2	1913447,55	410
0,0315 *			

***= Significativo 5%. ns= no significativo. Fuente: Bracho, 1994.**

Tabla 2. Análisis multivariado de varianzas de la variable acidez (ml de NaOH 0,1N/100l) de muestras de leche vacas en primera, segunda y tercera lactancias durante un período de seis meses.

ACIDEZ			
Fuente	GL	Estad. Multivariado.	F.
Equivalente	P>F		
Período Lact. /	10	Wilk's 0,2966	2,94
0,011**			
Lactancia		Roy's 1,138	4,09
0,011**			
Período de	5	Wilk's 0,253	10,03
0,0001**			
Lactancia		Roy's 2,958	10,03
0,0001**			

ANOVA SS

Lactancia	2	76,65	5,98
0,0088**			

****= Significativo 1%. Fuente Bracho, 1994.**

Se determinaron en muestras de leche de cabras mestizas, la concentración de la enzima lactoperoxidasa (LPO) cualitativa y cuantitativa, la acidez titulable y el pH a diferentes tiempos de envejecimiento, a temperatura ambiente y sometida a refrigeración; representadas en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Promedios de los valores obtenidos para las variables: acidez titulable, pH. y actividad enzimática en los niveles de tiempo de envejecimiento: 12, 24, 48 y 72 horas en muestras de leche cruda de cabras mestizas a temperatura ambiente (24-35 ° C).

Horas Enzimática	Acidez Titulable (ml. de NaOH 0.1N/100 ml)	pH (eq/l)	Actividad U/ml
12	15,29	6,30	3,985
24	77,86	4,30	3,674
48	91,43	4,20	3,664
72	111,43	4,14	3,612

Fuente: Bracho, 1994.

Tabla 4. Promedios de los valores obtenidos para las variables: Acidez titulable, pH. Y actividad enzimática en los niveles de tiempo de envejecimiento: 12, 24, 48 y 72 horas de muestras de leche cruda de cabras mestizas, sometida a refrigeración (7-10 ° C)

Horas Enzimática	Acidez Titulable (ml. de NaOH 0.1N/100 ml)	pH (eq/l)	Actividad U/ml
12	15,29	6,39	3,985
24	15,57	6,36	3,860
48	16,29	6,30	4,048
72	17,14	6,10	4,003

Fuente Bracho: 1994

Se determinaron en las muestras de leche de vacas mestizas, en primera, segunda y tercera lactancias, durante un período de seis (6) meses, las concentraciones de lactoperoxidasa cuantitativa y acidez titulable para graficar en perfiles su comportamiento, representados en las Figuras 2 y 3.

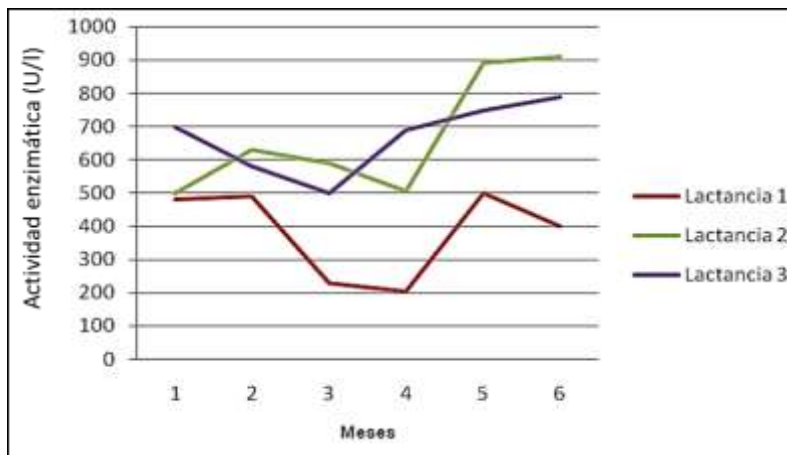


Figura 2. Perfiles promedio del variable volumen de actividad enzimática (U/l) de la leche de vacas en primera, segunda y tercera lactancia, durante un período de seis (6) meses. U/L= Unidades sobre litro. Fuente Bracho: 2010.

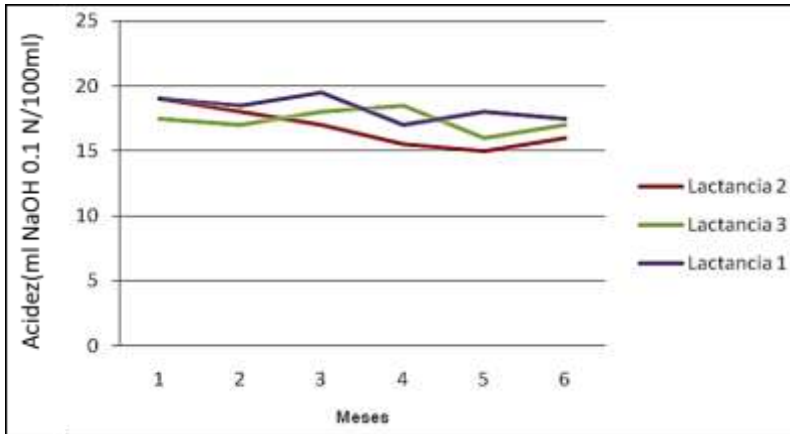
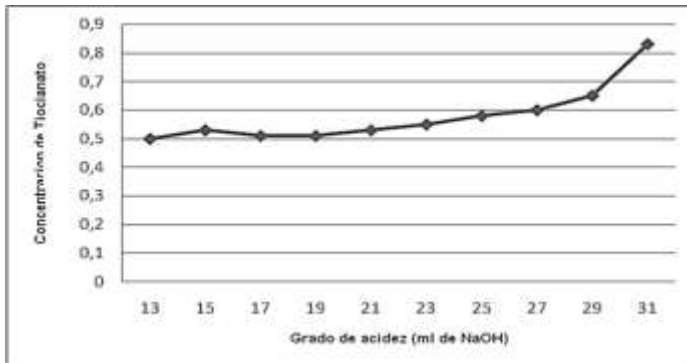


Figura 3. Perfiles promedio de la variable acidez de la leche de vacas en primera, segunda y tercera lactancia, durante un período de seis (6) meses. Fuente: Bracho 1994.



Se elaboraron las curvas de calibración para establecer las concentraciones reales de tiocianato en leche de cabras y vacas según el grado de acidez y el pH, respectivamente y aparecen representadas en las figuras 4 y 5.

Figura 4. Curva de calibración de la concentración de tiocianato (mg/l) en la leche de cabras de acuerdo al grado de acidez. Fuente: Bracho, 1994.

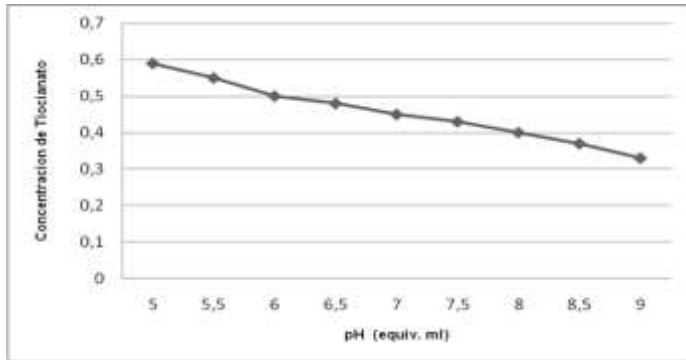


Figura 5. Curva de calibración de la concentración de tiocianato (mg/l) en la leche de vacas de acuerdo al pH. Fuente: Bracho, 1994.

Se analizó la comparación de la concentración de lactoperoxidasa (U/l) y de tiocianato (mg/l) en la leche de vacas mestizas; comportamiento que puede ser observado en la Figura 6

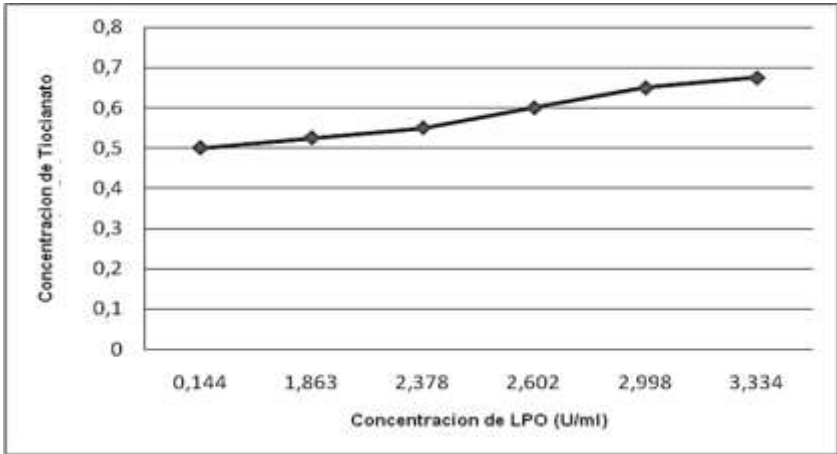


Figura 6. Comparación entre la concentración de lactoperoxidasa (LPO) y concentraciones de tiocianato mg/l en leche de vacas mestizas. Fuente: Bracho, 1994.

Considerando que el pH es uno de los factores que afecta la concentración de tiocianato en la leche cruda, en la Figura 7, se puede ver su comportamiento en un rango de pH 6 a 6,8 equiv. /ml.

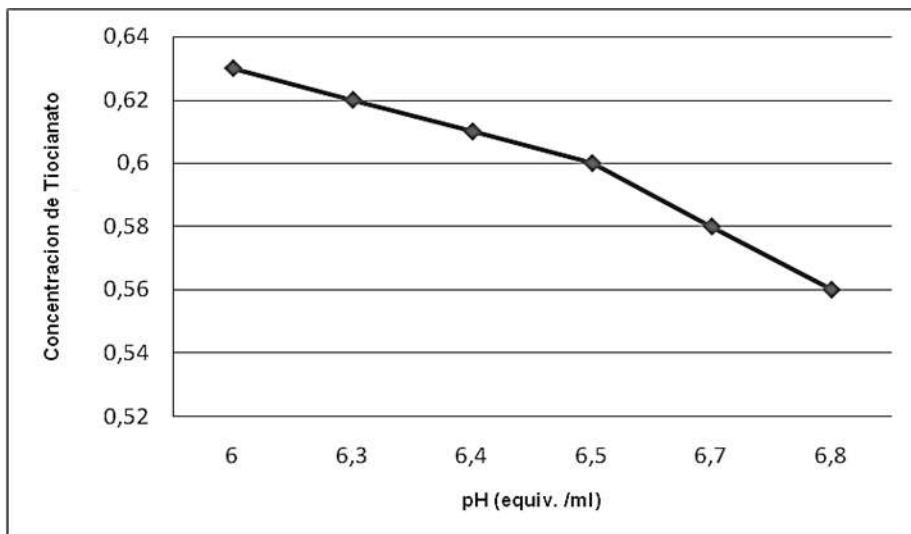


Figura 7. Concentraciones de tiocianato mg/l en leche de vacas mestizas en función del rango de pH óptimo (6 a 6,8 equiv/ml). Fuente: Bracho, 1994.

La estadística descriptiva indica la fluctuación de las variables actividad enzimática de la LPO, tiocianato SCN^- , pH y acidez titulable en la leche cruda de cabras mestizas, presentadas en la Tabla 5; donde se reportan valores de concentración de tiocianato (SCN_2) en leches de cabras mestizas, por primera vez en Venezuela.

Tabla 5. Estadística descriptiva de las variables LPO, SCN⁻, pH y acidez titulable en la leche cruda de cabras mestizas.

Variables	N ^o muestras	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Valor mínimo	Valor máximo
LPO	128	3,98	0,72	17,98	0,05	4,93
SCN ⁻	128	0,09	0,03	39,11	0,02	0,22
pH	128	6,94	0,15	2,15	6,40	7,50
AC	128	17,77	1,53	8,60	15,00	25,00

Leyenda: LPO=Actividad enzimática: U/l. Concentración de SCN⁻= mg/l. AC=Acidez Titulable ml de NaOH al 0,1N/100 ml. pH: equiv/ml. Fuente: Bracho, 1994.

Se determinó la concentración de tiocianato presente en la leche de cabras mestizas en diferentes lactancias o partos, así mismo, se establecieron diferencias de concentración de tiocianato entre los partos y se representan en las tablas 6 y 7).

Tabla 6. Concentración promedio del ion tiocianato (SCN⁻) en la leche de cabras, entre el número de partos.

Nº de Partos	Nº de Muestras	Media	Desviación estándar
1	28	0,08222 1	±0,035010
2	32	0,08052 5	±0,027923
3	32	0,09421 9	±0,031177
4	36	0,09445 3	±0,042657

Fuente Bracho: 1994.

Tabla 7. Comparación de las medias de concentración de tiocianato (SCN⁻), en la leche de cabras mestizas, según el número de partos.

Partos	Grado de Libertad	Promedio	Significancia
1ero Vs 2do	0,208635	0,835464	N.S
1ero Vs 3ero	-1,40419	0,165596	N.S
1ero Vs 4to	-1,20326	0,233764	N.S
2do Vs 3ero	-1,85083	0,068959	N.S
2do Vs 4to	-1,54539	0,127341	N.S
3ero Vs 4to	-0,025093	0,980061	N.S

P>0,05 No significativo. P<0,05 Significativo. P<0,001 Altamente significativo. N.S= No significativo.

Fuente: Bracho, 1994.

Se determinaron cuantitativamente la concentración de tiocianato (mg/l) en muestras de calostro y de leche cruda de vacas mestizas en el primer mes de lactancia, controlando los factores acidez, pH y temperatura (Figura 8)

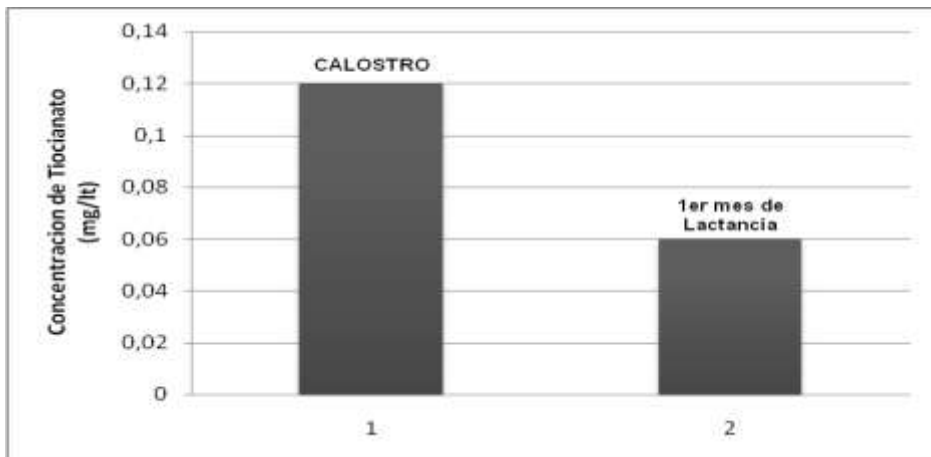


Figura 8. Comparación de la concentración de tiocianato (mg/l) en el calostro y en la leche cruda de vacas mestizas al primer mes de lactancia.

Fuente: Bracho 1994.

Se determinó la concentración de tiocianato (SCN^-), Lactoperoxidasa (LPO), pH y acidez titulable en muestras de leche de vacas mestizas en diferentes estados de lactación y periodos de lactancias, tomando en cuenta la alimentación. (Tabla 8)

Tabla 8. Estadística descriptiva para las variables Tiocianato (SCN⁻), Lactoperoxidasa (LPO), pH, acidez titulable en la leche de vacas mestizas.

Variables	N ⁰ Muestras	Media	Desviación estándar	Coef. de variación	Valor Mínimo	Valor Máximo
pH	160	6,50	0,22	$3,38 \times 10^{-2}$	6	6,90
AC	160	17,38	1,29	$7,45 \times 10^{-2}$	14	22,00
LPO	160	2,58	0,75	$28,29 \times 10^{-2}$	0,76	4,83
SCN ⁻	160	0,59	0,31	$52,46 \times 10^{-2}$	0,10	1,60

Leyenda: SCN⁻ = Concentración de Tiocianato en mg/L. LPO = Actividad enzimática en U/l. AC = Acidez titulable en ml de NaOH al 0,1N/100 ml. pH = equiv./ml. Fuente: Bracho, 1994

Se determinó acidez, pH y actividad enzimática de la lactoperoxidasa en leche calostrual y leche cruda de vacas mestizas, valores presentados en la Tabla 9.

Tabla 9. Características del calostro de vaca al primer día de parto y de la leche al primer mes de lactancia, en la primera, segunda, tercera y más lactancias en los parámetros: acidez, pH y actividad enzimática.

Variables	Lactancia 1 Lactancia >= 3	Lactancia 2
Primer día de Parto (la mediana de los valores)		
Acidez (ml de NaOH 0,1N/100ml)	37,60 26,130	27,135
pH	5,0 6,2	5,75
Actividad enzimática (U/l)	124,42 164,22	102,09
Primer mes de lactancia (la mediana de los valores)		
Acidez (ml de NaOH 0,1N/100ml)	10,09 17,005	10,92
pH	6,5 6,5	6,5
Actividad enzimática (U/l)	303,9 753,54	394,39

U/l Unidades Internacionales. Fuente: Bracho. 1994.

Se ensayó la activación del sistema Lactoperoxidasa LPO en leche bovina, a través de adición de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y tiocianato de potasio, con la finalidad de monitorear la acidez en un período de tiempo de 0 a 96 horas sometida semanales a refrigeración, comportamiento presentado en la Figura 9.

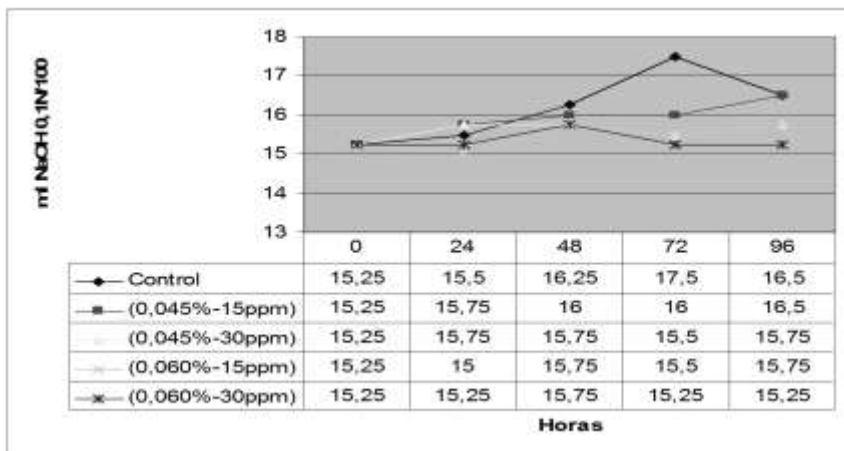


Figura 9. Acidez (ml NaOH 0,1N/100ml.) de leche de cabras mestizas conservadas mediante activación del sistema lactoperoxidasa en condiciones de refrigeración.

Leyenda Figura 9:

Control = leche de cabra sin activación

0.045 % = porcentaje de peróxido de hidrógeno

15 ppm = partes por millón de tiocianato de potasio

0.060 % = porcentaje de peróxido de hidrógeno

30 ppm = partes por millón de tiocianato de potasio

Fuente; Bracho 1994.

Se monitorio la elevación de la acidez de la leche cruda de cabras mestizas, sometida a conservación por activación del sistema lactoperoxidasa, a temperatura ambiente (25 a 30°C), para evaluar el efecto del sistema LPO activado sobre la acidez de la leche, y así demostrar que ejerce control sobre los microorganismos que desdoblán el azúcar de la leche (lactosa), disminuyendo la producción del ácido láctico que acidifica la leche, manifestándose su deterioro, al salirse de los

rangos establecidos en las normativas de calidad de leche como materia prima para la industria; comportamiento que puede ser observado en la Figura 10. La concentración 0,060% de peróxido de hidrógeno y 30ppm de tiocianato de potasio ofrece el mejor comportamiento a temperatura ambiente.

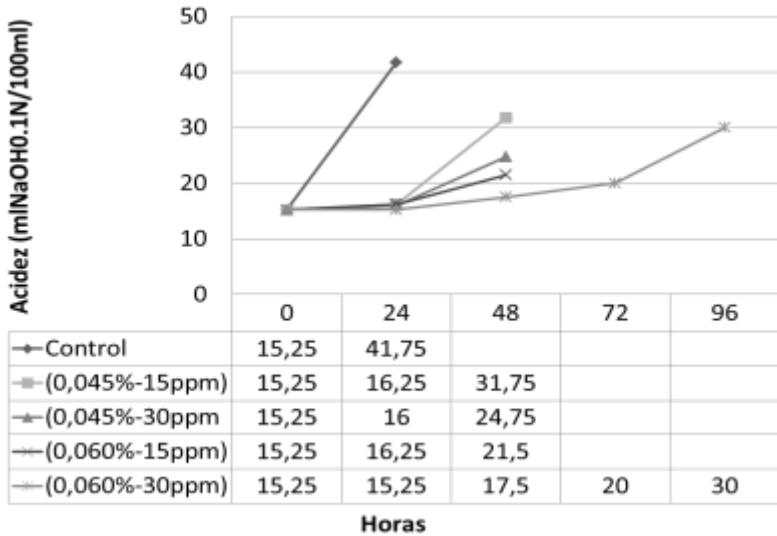


Figura 10. Acidez (ml NaOH 0,1N/100ml.) de leche de cabra mestizas, conservada mediante activación del sistema lactoperoxidasa SLPO), a temperatura ambiente.

Leyenda Figura 10:

Control = leche de cabra sin activación

0.045 % = porcentaje de peróxido de hidrógeno

15 ppm = partes por millón de tiocianato de potasio

0.060 % = porcentaje de peróxido de hidrógeno

30 ppm = partes por millón de tiocianato de potasio

Espacio en blanco = No determinado por acidificación de la leche.

Fuente: Bracho, 1994

Se determinó la calidad sanitaria de la leche cruda de cabras mestizas por la presencia de microorganismos: mesófilos aerobios en unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) y coliformes totales en coliformes totales por mililitro (col/ml) con respecto a la Técnica del Número Más Probable (NMP) de coliformes totales, a las 24 horas post-activación del sistema LPO a temperatura ambiente (25-30°C) y de refrigeración (8-12°C); utilizando diferentes tratamientos o concentraciones de sustratos activadores: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y tiocianato de potasio (SCN⁻), para su conservación bajo la activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO) y, se presentan en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Promedio de variables microbiológicas de la leche cruda de cabras mestizas por tratamientos, conservada 24 horas post-activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO), a temperatura ambiente.

Tratamiento	\bar{X} Mesófilos aerobios(ufc/ml)	\bar{X} Coliformes totales (col/ml)
1	2,41x10 ⁵	803
2	3,1x10 ⁵	9
3	1,7x10 ⁵	6,5
4	3x10 ⁵	3
Total	2,5x10 ⁵	205,375

Tratamientos:

1 = 0,045 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻

2 = 0,045 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻

3 = 0,06 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻

4 = 0,06 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻

Fuente Bracho, 1994.

Tabla 11. Promedios de variables microbiológicas de la leche cruda de cabra mestizas, por tratamientos, conservada 24 horas post-activación del sistema lactoperoxidasa en condiciones de refrigeración.

Tratamiento	\bar{X} Mesofilos aerobios (ufc/ml)	\bar{X} Coliformes totales (col/ml)
1	4,4x10 ³	3,2
2	4,9x10 ³	3,2
3	6,5x10 ³	3,8
4	5,01x10 ³	3
Total	5,1x10 ³	3,3

Tratamientos:

1 = 0,045 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻

2 = 0,045 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻

3 = 0,06 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻

4 = 0,06 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻

Fuente: Bracho, 1994.

En la Tabla 12, se puede observar el análisis de varianza de la acidez titulable de la leche cruda de cabras, donde con una probabilidad de P=0,0008 y P=0,0000 que el comportamiento

de la acidez frente a la concentración de aditivos TraQ y condición ambiental TraT a las 24 horas es muy significativo.

Tabla 12. Análisis de varianza de la variable acidez titulable de la leche cruda de cabras mestizas en la activación del Sistema Lactoperoxidasa para los factores: Concentración de aditivos (TraQ) y condición ambiental (TraT) a las 24 horas.

Fuente	Df	MS	F	P
TraQ	3	4,0227	6,9143	0,0008**
TraT	1	15,4917	26,6272	0,0000**

TraQ 1. 0,045 % H ₂ O ₂ ; 15 pm SCN ⁻	(P<0,00001)
2. 0,045 % H ₂ O ₂ ; 30 pm SCN ⁻	(P<0.05)
3. 0.06 % H ₂ O ₂ ; 15ppm SCN ⁻	
4. 0,06 % H ₂ O ₂ ; 30 ppm SCN ⁻	

** Muy significativo.

TraT. 1: Temperatura ambiente. 2: En refrigeración. Fuente: Bracho, 1994.

Se caracterizó microbiológicamente la leche cruda bovina post activación del sistema lactoperoxidasa a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración.

Se verificó la presencia de microorganismos *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y fecales, mesófilos aerobios y *Escherichia coli*, en la leche cruda de vacas

mestizas antes y después de ser sometidas a conservación mediante la activación del sistema lactoperoxidasa.

Se determinó el tiempo de inhibición de los microorganismos post activación del sistema LPO utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y tiocianato de potasio, como sustratos donadores de electrones en el proceso de activación del sistema LPO para establecer que no hay producción de ácido láctico.

Se determinó la calidad sanitaria de la leche cruda de vacas mestizas por la presencia de microorganismos: mesófilos aerobios en unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml), coliformes totales en coliformes por mililitro (col/ml) por la técnica del Número Más Probable (NPM) de coliformes totales y *Staphylococcus* sp, expresados como microorganismo por mililitro; a las 24, 48, y 72 horas post-activación del sistema LPO a temperatura ambiente (25-30°C) y de refrigeración (8-12°C), utilizando diferentes tratamientos o concentraciones de sustratos activadores: 1= 0,045 % H₂O₂; 15 pm SCN⁻; 2=0,045 % H₂O₂; 30 pm SCN⁻; 3= 0,06 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻; 4= 0,06 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻; peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y tiocianato de potasio (SCN⁻), respectivamente, para su conservación bajo la activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO) y, se presentan en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13. Promedios de las variables mesofilos aerobios (ufc/ml) coliformes totales (NMP/ml y *Staphylococcus* (mo/ml) en leche cruda de vacas mestizas post activación del sistema LPO; por tratamientos: 1= 0,045 % H₂O₂; 15 pm SCN⁻ ; 2=0,045 % H₂O₂; 30 pm SCN⁻ ; 3= 0,06 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻ ; 4= 0,06 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻ ; a las 24, 48 y 72 horas, a temperatura ambiente.

Tratamientos/Horas <i>Staphylococcus</i> sp	M.aerobios	C. totales
1,2,3,4/ 24h.	1,0X10³	<3
<100		
1,2,3,4/ 48h.	3,8X10⁴	<3
<100		
1, 2,3,4/ 72h.	1,2X10⁴	<3
<100		

Fuente: Bracho, 1994.

Tabla 14. Promedios de las variables Mesofilos aerobios (ufc/ml) Coliformes totales (NMP/ml y *Staphylococcus* (mo/ml) en leche cruda de vacas mestizas post activación del sistema LPO; por tratamientos: 1= 0,045 % H₂O₂; 15 pm SCN⁻ ; 2=0,045 % H₂O₂; 30 pm SCN⁻ ; 3= 0,06 % H₂O₂; 15 ppm SCN⁻ ; 4= 0,06 % H₂O₂; 30 ppm SCN⁻ ; a las 24, 48 y 72 horas, en refrigeración.

Tratamientos/Horas <i>Staphylococcus</i> sp	M.aerobios	C. totales
1,2,3,4/ 24h. <100	3,2X10 ²	<3
1,2,3,4/ 48h. <100	3X10 ¹	<3
1,2,3,4/ 72h. <100	1,5X10 ¹	<3

Fuente: Bracho, 1994.

DISCUSIÓN

Los análisis estadísticos indican que la actividad enzimática resulta afectada por las diferentes lactancias y períodos de lactación; durante los tres primeros meses se verificó el mayor volumen de actividad enzimática, el tercer mes es el de mayor volumen de actividad, para comenzar a disminuir, encontrándose el menor valor en el quinto mes; confirmándose lo reportado por Griffiths en 1986 y Bracho en 1994, que la actividad enzimática es ampliamente influenciada por las lactancias y períodos de lactación de las vacas.

Además se detectó fuerte interacción entre lactancias y períodos de lactación, sin embargo, es necesario tomar en cuenta el sistema de manejo alimenticio al que estén sometidos los animales, que pueden influenciar la variabilidad detectada en los datos. Por otra parte se evidenció que el cuarto de la ubre no ejerce ningún efecto.

La concentración de actividad enzimática obtenida a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración, superan el rango superior de 3,55U/ml reportado por Zapico *et al.*, 1990

Los valores de volumen de actividad enzimática con respecto al envejecimiento de la leche en condiciones de refrigeración, se mantienen coincidiendo con lo reportado por Kamau *et al.*, 1990; Pruitt y Kamau, 1991 quienes afirmaron que en condiciones de refrigeración se mantiene el mismo nivel de actividad.

El pH y la acidez son variables modificadoras de la actividad enzimática de la enzima lactoperoxidasa de la leche cruda caprina y bovina a temperatura ambiente (24-35 ° C), sometidas a niveles de tiempo de envejecimiento: 12, 24, 48 y 72 horas asemejándose con lo reportado por Bergmeyer, 1994. La muestra de leche control antes y después de ser sometida a pasteurización lenta (60-63 ° C/30min) fue positiva a la detección de peroxidasa cualitativa, corroborando lo citado por Rodríguez y Martín (1980), quienes reportaron la termo estabilidad de la enzima LPO, y como es capaz de indicar cuando se ha producido sobrecalentamiento de la leche.

El volumen de actividad enzimática de la LPO y la acidez en el calostro de vacas es alto en el primer parto, el grado de mestizaje pudiera atribuir diferencias, (Bracho 1994), la acidez es significativamente mayor en el calostro, si se compara con la leche cruda y leche de vacas positivas a mastitis, con

tendencia a disminuir en la medida en que aumenta el número de partos.

Los promedios de volumen actividad enzimática en el calostro fueron más bajos que en la leche cruda al primer mes de lactancia, lo cual concuerda con lo reportado por Perraudin en 1991 y por Bracho en 1994.

Los análisis estadísticos describieron ampliamente las fluctuaciones de la concentración tiocianato SCN⁻, y sus factores de variación en la leche cruda de cabras y vacas mestizas, donde se reportan valores de concentración de tiocianato (SCN⁻) en la leche de cabras mestizas, por primera vez en Venezuela.

Los resultados demuestran que la acidez y la calidad sanitaria de la leche de cabras mestizas medida por la carga microbiana (mesofilos aerobios y coliformes totales) están influenciadas por la concentración de sustratos activadores (Peróxido de hidrógeno y tiocianato de potasio) utilizados para activar el sistema lactoperoxidasa (SLPO), impidiendo la acidificación de la leche al actuar como bactericida y bacteriostático en la misma; una vez que se activa el sistema enzimático y se monitorea su vigencia a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración, sin alterar las características

iniciales de la leche tal como lo reportan (FAO, 1990), (IFD, 1988; Ponce *et al.*, 1994; COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 1999 y Bracho, 2013).

A temperatura ambiente a las 24 horas de activado el sistema lactoperoxidasa se observó la acción bacteriostática de este en todas las concentraciones a excepción del control. A las 48 horas se demostró que las concentraciones: 0,06/15ppm y 0,06/30ppm de peróxido de hidrógeno y tiocianato respectivamente, aún mantienen el efecto bacteriostático, anulándose a las 72 horas; resultados que superan los reportes hechos por (FAO/OMS, 1991) y (Haddadin, *et al.*, 1997), quienes señalaron la efectividad del sistema LPO entre 8 y 18 horas.

Se verificó el efecto antibacteriano del sistema LPO en leche bovina y caprina sobre microorganismos: mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. Observando que cuando se mantuvo bajo refrigeración, por una acción sinérgica con el sistema LPO, la leche fue conservada hasta 72 horas, en concordancia con lo reportado por: (Aparicio *et al.*, 1986), (IFD, 1988); (CIEPE, 1992); Zajac, *et al.*, 1993); (Bracho, 1994); (Ponce *et al.*, 1994), (Stefano *et al.*, 1997) y (Gaya *et al.*, 1997), demostrando el efecto antibacteriano del sistema

lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno, sobre la carga microbiana, inhibiendo la acción de microorganismos que producen el desdoblamiento de la azúcar de la leche (lactosa) produciendo ácido láctico que acidifica la leche cruda en ausencia de refrigeración, colocándola al margen del cumplimiento de la normativa legal vigente (COVENIN 658-86; 798-89; 938-83;902-82; 903-93; 1104-84; 1126-89; 1292-89).

Se evaluó el comportamiento del mecanismo de protección de la ubre con mastitis subclínica en diferente grado de inflamación, diagnosticada mediante los métodos: California Mastitis Test (CMT) y cultivo bacteriológico de muestras de leche por cuartos de la ubre de la vaca, identificando el agente causal.

CONCLUSIONES

El conocimiento de la concentración de lactoperoxidasa en la leche cruda es importante para establecer las concentraciones de los agentes activadores del Sistema LPO; peróxido de hidrógeno y tiocianato de potasio.

Las lactancias (partos) y períodos de lactación (meses), afectan el volumen de actividad enzimática, comprobándose que los valores más altos corresponden a la tercera lactancia y al tercer período de lactación.

En las vacas de primer parto se pudo verificar el mayor volumen de actividad enzimática en el calostro, manteniéndose valores altos al primer mes de lactación, por otra parte la acidez también es alta; variando en forma decreciente en la medida que aumenta el número de partos.

Los cuartos de la ubre no ejercieron ningún efecto sobre el volumen de actividad de la enzima.

Las muestras de leche cruda de cabras y vacas sometidas a niveles de tiempo de envejecimiento: 12, 24, 48, y 72 horas, a temperatura ambiente, presentaron cierta disminución de la actividad enzimática, acidez y el pH, mientras que en

condiciones de refrigeración se mantuvo en un rango casi constante, es decir que inclusive a las 72 horas existían cantidades de enzima LPO ejerciendo una protección de la leche.

Aun cuando en Venezuela, la Reglamentación vigente prohíbe el uso de los sustratos activadores del Sistema Enzimático LPO (Tiocianato de potasio y peróxido de hidrógeno), es un procedimiento tecnológico aprobado en la 35 V^a. Reunión de la Organización Mundial de la Salud en 1990 (Informe Técnico No. 789) y recomendado por el Comité Mixto FAO-OMS en el código de principios referentes en la leche y productos lácteos (documento CX 5 – 70, Vigésimo segundo período de sesiones, párrafo 69-72 año 1990); estos hechos constituyen elementos de particular importancia para iniciar estrategias a fin justificar por razones técnicas, jurídicas y sociales que el sistema enzimático (LPO) no contiene residuales, inhibidores o tóxicos ajenos a los componentes naturales de la leche, sino que por el contrario resulta inocuo para la salud humana y animal.

El uso del sistema enzimático (SLPO) como un mecanismo de preservación temporal en la leche cruda bovina y caprina al retardar la acidificación y reducir la multiplicación bacteriana, puede mejorar las posibilidades de comercialización de la leche

cruda como materia prima para las plantas procesadoras y al público en general, contribuyendo a incrementar el consumo de leche fluida con mejores condiciones higiénicas y sin riesgos de toxicidad comprobada. Si bien el efecto bactericida logrado por el sistema LPO es inversamente relacionado a la temperatura de almacenamiento, los contaje bacterianos están por debajo de lo establecido en la normativa legal vigente. En zonas de producción donde actualmente se ejecutan dos acopios o recolecciones al día por no existir refrigeración, se podrá establecer solamente uno, con el consecuente ahorro de combustible, caucho y vehículos.

A nivel de plantas procesadoras de leche y derivados se garantiza un ahorro de energía eléctrica en el almacenamiento de leche cruda en silos antes de su procesamiento.

El alargamiento de la vida útil de la leche de cabra hasta las 72 horas en temperatura ambiente, resulta importante para el circuito animal y específicamente para la ganadería caprina en el Estado Falcón, base económica de las poblaciones que habitan las regiones áridas y semi-áridas que ocupan el 53% de la superficie territorial, explotaciones que funcionan en sistemas de producción extensivos con múltiples deficiencias en la infraestructura para la producción.

Más aún cuando el Gobierno Bolivariano del Estado Falcón emitió un decreto mediante el cual se declara a la especie caprina cómo actividad económica y social prioritaria de esta región.

Las características microbiológicas de la leche cruda bovina representada por los mesófilos aerobios., coliformes totales y *Staphylococcus*, antes de la activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO), registran variaciones al disminuir sus contajes luego de activar el sistema, mediante la adición de sustratos donadores de electrones: peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y tiocianato (SCN^-) a los niveles naturales de la enzima lactoperoxidasa existente en la leche cruda.

Se puede enfatizar que a temperatura ambiente utilizando concentraciones de peróxido de hidrogeno y tiocianato: 0,06/15ppm y 0,06/30ppm respectivamente, para la activación del sistema LPO, se inhibe la carga microbiana especificada a las 24 y 48 horas a temperatura ambiente y, asociado a la refrigeración, el Sistema LPO, actuó como bacteriostático hasta las 72 horas en todas las concentraciones utilizadas manteniendo la acidez de la leche bovina en promedio 17mlNaOH 0,1N/100ml de leche.

Los resultados obtenidos indican que para ambas condiciones de temperatura los tratamientos activadores bajo la concentración 0.060 % de peróxido de hidrógeno y 30 ppm de tiocianato de potasio son los más indicados para la conservación de las cualidades fisicoquímicas de la leche cruda caprina, ya que dicha concentración fue capaz de mantener la calidad de la leche por 72 y 96 horas para temperatura ambiente y condiciones de refrigeración, respectivamente, tomando como indicativo principal los valores de acidez titulable y TRAM de acuerdo con lo establecido con la norma COVENIN N° 658-86 y 939-79, respectivamente.

Al menos una tercera parte de la leche que se produce en América Latina y el Caribe, así como en el Estado Falcón, se destina a la fabricación artesanal de productos lácteos, básicamente queso fresco, dulce de leche y la venta directa de leche cruda. La calidad de la leche continúa siendo uno de los problemas que limita la competitividad de los productos y las industrias lácteas asociadas a éstos, pues no se trata solo de restricciones económicas y de infraestructura, sino también de orden práctico debido a la gran diversidad de escalas productivas existentes, que no siempre permiten modernizar los sistemas de producción, conservación y manipulación de la leche cruda. La activación del sistema lactoperoxidasa

constituye una solución práctica para aquellas condiciones en que se hace imposible establecer sistemas de refrigeración.

RECOMENDACIONES

El uso de la tecnología de activación del Sistema Enzimático LPO como mecanismo de alargamiento de la vida útil de la leche cruda, debe ser supervisado por instituciones de educación superior, así como por los organismos de desarrollo regional que se encargan de hacer asistencia técnica a los productores agropecuarios, o por la vía de servicios.

Es importante destacar que se hace necesario emprender los trámites necesarios para modificar la Resolución Sobre Leche y Derivados del Reglamento General de Alimentos en Venezuela, vigente desde 1959, así como también, modificar la Norma COVENIN sobre leche cruda que permitan la utilización del proceso de activación enzimática.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AIMUTIS, W Y EIGEL, W. 1982. Identification of Casein as Plasmin Derived fragments of Bovine Alfa S1 Casein. Journal Dairy Science. 65:175-181.
- ALAIS C. y BLANC, B. 1985. Milk Proteins: Biochemical and Biologicals Aspects. Wild Rev. Nutr Diet., 20 (1): 66-71.
- ALAIS, C. 1991. Ciencia de la leche: Principios de Técnicas Lecheras. Compañía Editorial Continental, S.A. México 594 p.
- ALFA LAVAL FOOD. 1990. Manual de Industrias Lácteas. 3ra ed. AMV ediciones. Mundi Prensa. Madrid, España 333 p.
- APARICIO, M; PERALTA, L; GARCIA, M. 1986. Potencialización of the Lactoperoxidase System for Preservation of Raw Milk in tropics. Archivos Latinoamericanos de Nutrición; 36 (1): 4-10. Caracas- Venezuela.
- ARIAS, F. 2008. Modelo de un Sistema Nacional de Generación y Transferencia de Tecnología Agrícola. Taller MPPAT-CEU-FAO. La Seguridad Alimentaria Mundial: Los Desafío del Cambio Climático y la Bioingeniería. FAO en Venezuela. 1-32 p.
- BENNET, A 1999. El sistema lactoperoxidasa (S-LP) de conservación de leche Online. Internet 02-04-2001. Disponible /FAO/ org/ ag/AGA/AGAP/LPS/diary/econf/proceeding/page 2 – sp.Htm.
- BEUMER, R; NOOMEN, A; MARIJS, J; KAMPELMACHER, E. 1985. Antibacterial action of the Lactoperoxidase System on Campylobacter jejuni in cow's milk. Neth. Milk Dairy Journal; 39: 104-107.

BJORCK, L and GLAESSON, O 1978. Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for lactoperoxidase system in milk. Journal Dairy Science. 62: 1211-1215.

BJORCK, L. and GLAESSON, O. 1980. Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against Escherichia coli. J. Dairy Sci. 63: 919-992.

BJORCK, L 1991. Indigenous Enzymes in milk. V. Lactoperoxidase Food Enzymology. Edited by Fox. Vol.1:100-106. Elsevier Applied Science. London, UK.

BOSCAN, L. 1973. Aspectos sanitarios de la leche de alta calidad. Seminario sobre la producción de la leche en Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. LUZ. Maracaibo – Venezuela p. 1-11.

BOURGEOIS, R., HERRERA, D. 1999. Enfoque Participativo para el Desarrollo de la Competitividad de los Sistema Agroalimentario. Ediciones IICA. San José de Costa Rica .pp 226

BLOOD, H. 1988. Medicina Veterinaria 6ta edición nueva editorial interamericana México D.F. 1411

BLOSSER, T. 1979. Economy losses from and the National Research Program of mastitis in the United States. J. Dairy Sci. 62; 119-127

BRACHO, H. 1992. Evaluación de la composición de la leche producida en los Municipios: Federación y Unión del Estado Falcón en base a la normativa legal vigente. Seminario de postgrado. Universidad Central de Venezuela. 62 p.

BRACHO, H. 1994. Determinación cuantitativa de la actividad de la lactoperoxidasa en leche bovina. Para optar al grado de

Magíster Scientiarum en Ciencias. Mención Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Central de Venezuela. p72.

BRACHO, H. 1997. Evaluación del efecto de aditivos antimicrobianos: formaldehído y peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la lactoperoxidasa bovina. Primera conferencia panamericana sobre calidad de los alimentos y nutrición. ILSI de México, A.C.

BRACHO, H. 1999. Legislación sanitaria para el registro y control de alimentos en Venezuela. Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" para Ascender a la Categoría de Profesor Asociado. Santa Ana de Coro, Falcón-Venezuela p.p. 69.

BRACHO, H. 2004. Actividad enzimática de la lactoperoxidasa (LPO) en leches bovinas y caprinas y activación del sistema LPO, como un mecanismo para conservar leche en ausencia de refrigeración. Trabajo presentado ante la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda para ascender a la categoría de Profesor Titular. Coro – Venezuela. p 110

BREWER CARIAS, 1985. Instituciones Políticas y Constitucionales. 2da Edición aumentada. Edición Conjunta. Universidad Católica del Táchira y Editorial Jurídica Venezolana. Caracas-San Cristóbal-Venezuela. PP. 341

BROWN, R.W.; MORSE, G.E. Newbold, F.H.S. y SANTEZ, L.W. 1969. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovines mastitis. National Mastitis Council Inc. Washington, D.C.

BRUNNER, J. 1970. Milk proteins in food proteins of Whitaker and Tannenbow. The AVI publishing Co. Inc. West Port. Conn. 201-203 p.

BRUNNER, J. R. 1981. Cow milk proteins Twenty-five years of progress. J. Dairy Sci. 63: 1038-1074.

CALVO, M; SANCHEZ, L; DOLORES, M. 2000. Proteínas de la leche con funciones defensivas. On line internet. 02.03.2001. Disponible: <http://milksci.unizar.es/divulg.html>.

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA. 1990. Proyecto Stabilak. San José de las Lajas. Provincia de la Habana. Cuba.

CHECHETKIN, A. 1984. Prácticas de bioquímica del ganado y aves de corral. Edit. Mir. Moscú, 3: 324-325.

C.I.E.P.E. 1992. Factores que determinan la calidad microbiológica de la leche. Unidad Agropecuaria de Industria Láctea Venezolana, C.A. Yaracuy-Venezuela. Pp 76.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 1988. Draft Guidelines for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system where refrigeration is virtually impossible. Doc. Cx/HF. 88/12.

COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS. 1999. Normas y códigos sobre leche y productos lácteos. Uso del Sistema Lactoperoxidasa donde es imposible la refrigeración. Doc. Cx/HF. 99/12.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 658-86. Determinación de acidez titulable.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No.798-89. Requisitos microbiológicos, leche pasteurizada.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 938-83. Técnicas o procedimientos de tomas de muestras de leche y productos lácteos.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 902-82. Recuento de Microorganismos Mesófilos Aerobios.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No 903-93. 2da Revisión Requisitos Microbiológicos, Leche cruda.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No1104-84. Determinación del número más probable (NMP). De Coliformes fecales y totales. Determinación de *Escherichia coli*.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No 1126-89. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 1292-89. Determinación *Staphylococcus aureus*.

CONNEL and HEADON. 1993. Lactoferrin, lactoperoxidase and Lysozyme; Nature's Protective Proteins. Biotechnology and the feed industry. T.p. Lyon; 4:123-132.

CORBIN, E. and WHITTIER, E. 1965. The composition of milk in Fundamentals of Dairy Chemistry of B.Weeband A.Johson. The AVI publishing Co-West Port. Conn. 2: 25-29 p.

DILANJAN, S. 1976. Fundamentos de la Elaboración del Queso. Editorial Acribia, de la Edición en Lengua Española. Zaragoza, España. p.p 121

FAO.OMS. 1991. Boletín Técnico No. 789. Documento CxS-70. Vigésimo Segundo Período de Sesiones 69-72. 35 va. Reunión OMS.

GACETA OFICIAL DE VENEZUELA. 1959. Ley Sobre Normas Técnicas y Control de Calidad. Nº 2529 Extraordinaire.

GAYA, P; MEDINA, M; NÚÑEZ; M. 1997. Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperature. Applied and Environmental Microbiology, 57 (11): 3355-3360.

GOURSAUD, J. 1991. Composición y Propiedades físico-químicas de la leche de vaca. Leche y Productos Lácteos vaca, oveja, cabra. Tomo 1. La leche de la mama a la lechería. Editorial Acribia S.A. 1:3-92.

HADDADIN, M; IBRAHIM, S; ROBINSON, R. 1997. Reservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase system. Food Control: 7 (3) 149-152.

HEESCHEN, W. 1995. Influence of Udder Disease (Mastitis) on quality and hygienic properties of milk Milchpraxis 33: 3, 108-113.

INTERNATIONAL COMISION O MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (I.C.M.S.F). 1983. Microbiología de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos. Vol. I. 2da. Edo. Acribia Zaragoza, España. 365 pp.

I.D.F. 1988. Código de práctica para preservación de leche fresca a través del Sistema Lactoperoxidasa. Boletín del Diario Internacional de la Federación de la Leche. No. 234: 3-5.

JIMÉNEZ, L.; MÁRQUEZ, N.; MORCUENDE, R. 2016. El papel que debe desempeñar el Médico Veterinario en el tratamiento de las mastitis es fundamental, implantando buenas prácticas de manejo y control. Informativo Veterinario Albéitar P.V. Servet Digital. España.

KAMAU, D.; DOORES, S. and PRUITT, K. 1990. Antibacterial activity of the Lactoperoxidase System against *Listeria monocitogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. Journal Food protection; 53: 1010A-1014. U.S.A.

KAMAU, D, N.; DORES, S & PRUIT, K. M. 1991. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocitogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. Journal Food Protection 53: 1010-4.

KONERMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R.; SAMMER, H. M. 1979. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Pippincot, Philadelphia.

KORHONEN, H. 1980. A new method for preserving raw milk: The Lactoperoxidase Antibacterial System. World animals. Rev; 35: 23-29.

KUTMER, M. H. 1974. Hypothesis testing in linear models. The American Statiscian No. 28. P 98-100.

LENHINGER, A. L. 1991. Principios de bioquímica. 2da. Ed. Ediciones Omega S.A. Barcelona – España. P. 120-218.

LINDEN, G; HUMERT, G. DESNOUVEAX, R. y PICKARD, J. 1982. Aplicaciones de la dilución completa de la leche para la determinación de algunas actividades enzimáticas. Le Laít 62, pp. 209-219.

LUCK, H. 1966. El empleo del agua oxigenada en leche y productos lácteos en higiene de la leche. ABDUSLAM-F.A.O.-O.M.S. Ginebra. p. 461-485.

MACFADDIN, J. F. 1976. Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams, Baltimore.

MAC-FONAIAP. 1980. Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. 2da. Ed. Caracas-Venezuela. 380. pp.

MAGDALENO, A., BRACHO, H. 2001. Estudio del mecanismo protector de la ubre frente a la mastitis, por activación del sistema lactoperoxidasa en infusión intramamaria. Trabajo Especial de Grado para Médico Veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro – Venezuela 63 p.

MAHIEU, H. 1991. Factores que influyen en la composición de la leche. Leche y productos lácteos, vaca, oveja, cabra. Tomo I. Acribia, S.A. p. 117-179.

MARTIN, F., LARIVIERE, S., GUTIERREZ, A. Y REYES, A. 1999. Pautas para el Análisis de los Circuitos Agroalimentarios. Ediciones Fundación Polar. Caracas. 237 p

MARTINEZ, C.E; MENDOZA, P. G; ALARCON, F. J; GARCIA, H. 1988. Reactivation of the Lactoperoxidase System during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk. Journal of food protection 51: 7. 558-561.

MARTINEZ, G. A. 1988. Diseño Experimental, Métodos y Elementos de Teoría Editorial Trilla, S.A. de C.U México.

MIJACEVIC, Z; OTENHAJMER, I; IVANOVIC, D. 1989. The antimicrobial effect of the lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide System in milk, 39: (13); 199-204.

MILLER, R. 1985. Multiple comparisons. Encyclopedia of Statistic Science. John Wiley and Sons. New York. P 679-689.

MULLAN, W.; WASTERHOUSE, A.; DAVIES, G. and WADE, V. 1980. The production and Storage stability of lactoperoxidase. Bull Dairy Industries International. 41 (12); 14-18.

PEREZ, M. 1994. Epidemiología de la Brucelosis Bovina. Curso de Actualización en Brucelosis. División de Postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia y Ministerio de Agricultura y Cría. p.p 1

PERRAUDIN, J. P 1991. Lactoperoxidase a natural preservative. J. Dairy Industries International; 56 (12): 21-24.

PONCE, P.; LÓPEZ, M. and MARTINEZ, E. 1994. Preservation of milk without refrigeration through the activation of the lactoperoxidase System. Rev. Animal Health. 9:2. 120-128.

PORTMAN, A; y AUCLAIR, J. 1999. Relation Between lactenin L2 ET. La lactoperoxidase. Le Lait. 39.147-158.

POUTERL y REINARD. 1981. California mastitis test guide of selective Dry Cow Therapy J. Dairy. Sci. 64 (2): 241-248.

PUTTER, J. 1974. Peroxidase in Methods of analysis enzymatic. Vol. Two, Second Edition. Edited by Hans Ulrich Bergmeyer. Academic Press. Inc.

PRINSLOO, N. SELLER, J. 1999. Producción lechera en las Highland de Sudáfrica. Online, Internet 02/04/2001. Disponible: [fao.org/aga/agap/lps/dairy/econf/proceeding/pp 2 –sp. Htm.](http://fao.org/aga/agap/lps/dairy/econf/proceeding/pp2-sp.htm)

Pruitt, K. M. and Kamau, D.N. 1991. The lactoperoxidase system of bivine and human milk. In oxidative Enzymes in Foods. Edited By Robinson D.S. and Skin N.A.M. Elsevier Science Publishers LTD. Crown House Linton Road, Barking, Essex JG11 8JU, England.

REITER, B. 1978. Review of the progress of Dairy Science. Antimicrobial System in milk. Journal of Dairy Research. Sci. 45: 131-147.

REITER, B. 1985. The lactoperoxidase system of bovine in the lactoperoxidase. System. Ed. K. M. Pruitt and Tenovuo, J. O. Marcel Dekker, New York; 60: 123-141.

RIVERO, K; SANGRONIS, K.; BRACHO, H. 1999. Evaluación de las pruebas de california mastitis test y Detector Electrónico Draminski en vacas a nivel de fincas. Trabajo especial de Grado para Médico Veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Cs. Veterinarias. Coro, Venezuela. pp 65.

ROBINSON, R. 1987. Microbiología Lactológica. Acribia, S.A. Vol. II. Zaragoza. España p. 39, 43, 116, 124, 133.

RODRÍGUEZ, B. N.; MARTÍN. E. 1980. Análisis de alimentos. Tomo I. Organización de Bienestar Estudiantil (O.B.E) Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela. 276 pp.

SAHA. S.K. and SINGHAL, K.K. 1993. Thiocyanate excretion in milk of different species of ruminates feed on mustard cake supplemented ration. Indian J. Dairy Sci; 4 (2): 43- 46.

SCARAMELLI, A. 1988. Comparación de tres métodos indirectos para la detección de mastitis subclínica bovina. B.vitria (1)- 64-65.

SIEVERS, G. 1983. Structure of Milk Lactoperoxidase. A study using circular dichroism difference absorption spectroscopy. *Biochym. Biophys Acta*, 624. 249-259.

STATICAL PROGRAM FOR SOCIAL SCIENCES (SPSS, Ver. 7.5)

.STEFANO, G.; PIACQUADIO, P.; SCIANCALEPORE, V. 1997. Effect of Lactoperoxidase System activation on acid production in raw milk at refrigeration temperature. *Latte*; 20 (10): 1128-1131.

TIZARD, J. 1992. *Inmunología Veterinaria. Destrucción del material extraño. El Sistema Micolide. 2da. Ed. P 23-26.*

VARGAS, T. Y LOPEZ, N. 1979. Normas para el examen de productos lácteos. Método oficial AOAC. VI edición 1945. Organization panamericana de la salud. No. 84, 1973.

WHITAKER, J. 1972. *Principals of enzymology for the food science. Marcel Dukker Inc. U.S.A.*

WHITE, C. H. and MARSHALL. 1973. Reductions of shelf life of from *Pseudomona fluorescens*. *Journal Dairy Sci.*; 56: 849-853.

ZAJAC, M; GLADYS, S.; SHARZYN. SKA, M.; HARNALY, G. and BJORCK, L. 1993. Change in bacteriological quality of raw milk stabilized by activation of its Lactoperoxidase System and Stored at different temperature. *Journal Food protection*; 46: 1065-1068.

Zapico, P; Gaya, P; Paz, M; Nuñez, M; Medina, M; De Paz, M.1991 Influence of Breed animal, and day of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *Journal Dairy Science. 74: 3,783-787.*

II

VARIACIÓN DE LA ACIDEZ Y DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACTOPEROXIDASA (LPO) DE LA LECHE BOVINA, POR LA ADICIÓN DE ANTIMICROBIANOS.

INTRODUCCIÓN

La actividad de la enzima lactoperoxidasa (LPO) en leche tratadas con aditivos antimicrobianos debe registrar variaciones, ya que su estructura, es muy inestable. Cuando se rompen los enlaces o puentes disulfuro se inhibe la actividad enzimática, también por condiciones adversas de pH por debajo de su pH óptimo 6.8 (Mansson Rahenthulla *et al.*, 1988).

En la preservación de la leche en ausencia de refrigeración el único aditivo permitido es el peróxido de hidrógeno H_2O_2 . (FAO, 1957), (CFR, 1984), (IFD, 1988), (FAO&FEPAL, 2012) el cual puede ser adicionado en concentraciones de 100 a 800 ppm que corresponden a una concentración en un rango de 2,9 a 23,5 mM de H_2O_2 .

Excesos de peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con HOSCN/OSCN para generar productos que más citotóxicos que peróxido de hidrógeno mismo. Por otra parte el peróxido de hidrógeno es altamente tóxico para las células animales. embargo, niveles de 100 μM o menos de peróxido de hidrógeno más la presencia de LPO y Tiocianato (SCN) protegen las células de los mamíferos de toxicidad (Pruit y Kamau, 1991).

La descomposición del Peróxido de hidrógeno en leche sucede en presencia de la enzima catalasa, componente normal de la leche, la cual cataliza la descomposición del Peróxido de hidrógeno a oxígeno activo y agua; mientras que la LPO necesita un donador de hidrógeno o compuesto oxidable para descomponer el Peróxido de hidrógeno (Shahani, 1966), (Robinson, 1991), Web y Alford, 1974); (Pütter, 1974), (Reiter 1985), (Pruitt and Kamau 1991).

Los datos reportados por el uso del peróxido de hidrógeno en la leche son: Sabor metálico transitorio hasta que se descompone totalmente; inactivación del ácido fólico, pérdida parcial del ácido pirúvico, pérdida de metionina, tirosina, triptófano y cisteína/cistina y finalmente acelera el deterioro oxidativo de la leche, bajando la calidad de los productos lácteos, (Thaer y Lakshmaiah, 1992), (Bracho 2013), Bracho, 2017). La velocidad de la destrucción del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en la leche cruda es alta al inicio y luego tiende a decrecer, estando en relación inversa con la concentración inicial de agua oxigenada (López, 1986). Su destrucción depende de la concentración inicial, de la temperatura (pasteurización) y de la actividad de las enzimas: catalasa y peroxidasa (Bracho, 2013), (Arias *et al.*, 2010).

La adición de formaldehído a la leche está basada en su efecto bactericida, pero, se observa una exacerbación de la

acidez titulable debido a que el formaldehído reacciona con los grupos amino primario y los grupos amino y guanidil, exceptuando los enlaces peptídicos (Bajaj y Rai, 1993), y con el grupo guanidino de los residuos de arginina (Horne y Parker, 1982), pudiendo actuar como inhibidor de los sistemas enzimáticos.

METODOLOGÍA

Por un período de ocho semanas, se tomaron muestras del tanque de enfriamiento, una vez finalizado el ordeño de las vacas Holstein de una Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Maracay, Venezuela.

Una vez en el laboratorio las muestras se sometieron a todas las determinaciones que se especifican más adelante, antes y después de la adición de aditivos antimicrobianos en diferentes concentraciones: peróxido de hidrógeno 0,06%; 0,045% y 0,03%, y formaldehído 0,5%; 0,25% y 0,10%, antes y después de pasteurizar.

Determinación de acidez titulable. Método COVENIN 658-1982.

Control e factores: pH y Temperatura. Métodos instrumentales. pH meter portátil MI 8314 con termómetro incorporado de (Hanna Instruments), para el control de factores condición estricta del Método de Pütter (1974).

Detección cualitativa de la enzima peroxidasa.

Ensayo de Arnold Modificado (López-Alcaide, 1986).

Determinación del Volumen de actividad de la LPO. Método cuantitativo. (Pütter, 1974) y los Principios de Análisis Enzimáticos de Bergmeyer (1965).

Pasteurización de la leche. Método de baja temperatura “Holder” mediante proceso discontinuo a 60-63^o C/30 minuto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para estudiar el efecto de los aditivos antimicrobianos formaldehído y peróxido de hidrógeno, en la leche refrigerada sin pasteurizar y pasteurizada, sobre las variables acidez y volumen de actividad enzimática, se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con parcelas divididas (Martínez, 1988), esquematizado en la Figura 1. En este existen tratamientos y repeticiones para tratamiento; a su vez cada parcela básica se subdividió en subparcelas y, sobre

estas se colocaron tratamientos (diferentes concentraciones de antimicrobianos). Este arreglo resultó útil al agrupar en una parcela principal el tratamiento de la leche con antimicrobianos y pasteurización y en parcelas secundarias las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y formaldehído asociadas o no a la pasteurización, para las variables acidez y actividad enzimática. Las variables pH y temperatura son controladas estrictamente por el métodos de determinación enzimática y así descartar su efecto. Se usó una microcomputadora con el paquete Statistix 4.0 (1985-1992)

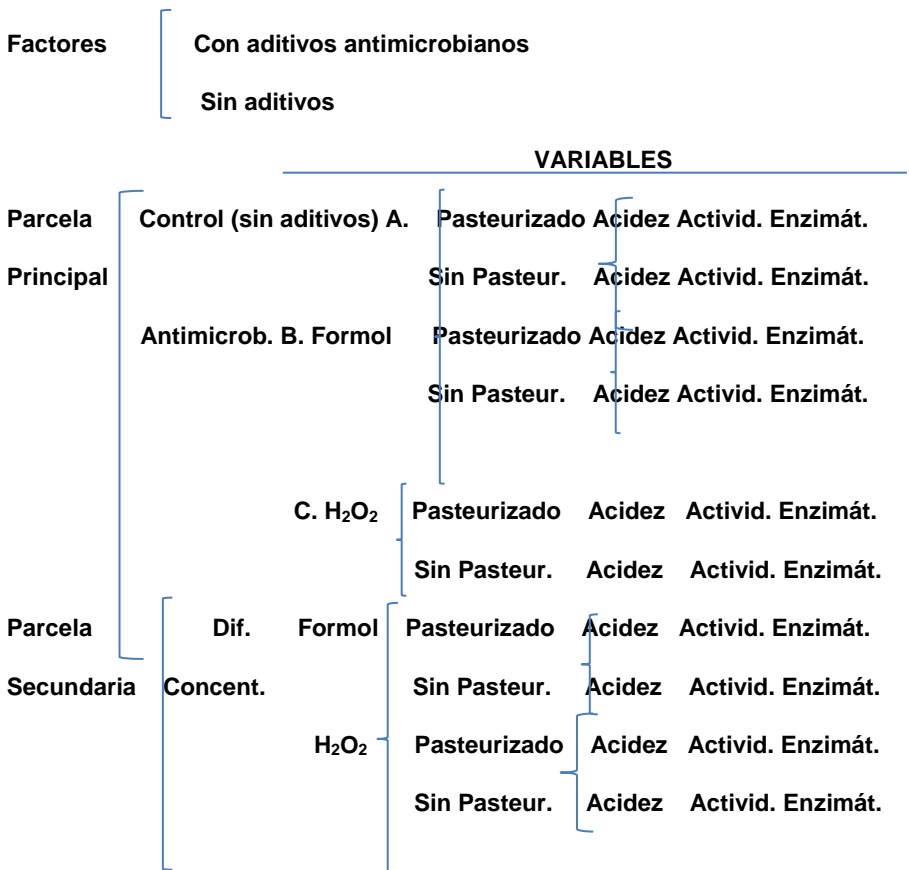


Figura 1. Diseño Experimental Bloques Completos al Azar con Parcelas Divididas: Fuente Bracho. 1994.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad enzimática de la LPO en leche bovina tratada con aditivos antimicrobianos.

Se procedió al análisis de los datos como parcelas divididas para lo cual se hizo un reacomodo de la información según un diseño de bloques completos al azar; calculando un promedio para el valor de las variables acidez y actividad enzimática en presencia o no de antimicrobianos, asociados o no a procesos de pasteurización. En esta primera agrupación de la información (parcela principal) se trató de evaluar el efecto de la presencia de antimicrobianos en la leche antes y después de pasteurizar, con respecto a las variables acidez y actividad enzimática.

En la Tabla 1 se puede ver el resumen del análisis de varianzas de las variables acidez y actividad enzimática agrupadas en promedios, las cuales resultaron muy significativas, es decir, la adición de antimicrobianos afectan los valores de ambas variables en la leche cruda. La pasteurización también es muy significativa al 1% para la acidez y significativa para actividad enzimática, demostrándose

que el proceso de pasteurización utilizado (60-63° C/30 min.) modifica el comportamiento de las variables en discusión. También es muy significativa (al 1%) la asociación antimicrobiano-pasteurización para la variable acidez pero, no significativa al 1% para la actividad enzimática, lo que demuestra que la acidez depende del antimicrobiano adicionado y de si es sometido a pasteurización o no, indicando que la temperatura de pasteurización potencian las reacciones de la leche adicionada de antimicrobianos.

Tabla 1. Análisis de varianza de las variables acidez (mL de NaOH 0,1N/100L) y actividad enzimática U/L de muestras de leche con adición de antimicrobianos antes y después de pasteurizar.

Fuente	Acidez				Actividad enzimática	
	GL	CM	F	P>F	CM	F
Antimicr. 0,0003**	2	448,22	434,76	0,00**	2,552	12,56
Error (a)	21	1,03097			4,266	
Pasteur. 0,0126**	1	3,3253	18,53	0,0003**	2,032	7,44
Antimicr. 0,1393ns	2	1,8817	10,49	0,0007**	3,021	2,17
X Pasteur.						

****= Significativo 1%**

ns= no significativo. Fuente: Bracho, 1994.

Los análisis de varianza discutidos condujeron a profundizar en el análisis, para lo cual se aplicaron pruebas posteriores como la determinación de las medias y el error estándar de la variable acidez de las muestras de leche, para la interacción detectada: adición de antimicrobianos (formaldehído, peróxido de hidrógeno con el sometimiento a procesos de pasteurización o no y sus respectivos controles (Tabla 2), donde se puede ver el comportamiento promedio de la acidez titulable expresado como (mL de NaOH 0,1 N/ 100ml de leche) de los controles y su error estándar, el cual varía muy poco (16,085±0,00) antes y después de pasteurizar y, (17,85±0,00) pasteurizado; muy diferente a la media de la acidez de la leche adicionada de formaldehído que resultó muy alta (25,33±7,95) sin pasteurizar y 26,16±6,99) pasteurizada.

Tabla 2. Medias de la variable acidez (mL de NaOH 0,1N/100 mL de muestra de leche para la interacción detectada adición de antimicrobianos: formaldehido y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) Con/ Sin Pasteurización.

Combinación de adición de antimicrobianos	
Con/Sin Pasteurización +/- Error Est.	Prom. Acidez
Pasteurizado Control	17,085+/-0,00
Formaldehido	26,154+/-6,99
H₂O₂	16,45+/-5,67
Sin Pasteurizar Control	16,085+/-0,00
Formaldehido	25,330+/-7,94
H₂O₂	16,706+/-4,80

Fuente: Bracho, 1994.

La media de la acidez de la leche adicionada de peróxido de hidrógeno es muy similar a la del control (16,71+4,80) sin pasteurizar y 16,45 +5,68) pasteurizada, demostrando que el peróxido de hidrógeno no afecta la acidez.

Es importante discutir que el Comité venezolano de Normas Industriales (COVENIN), en la Norma Leche Cruda 903-93 (R) y Leche Pasteurizada 978-93 (R), establecen un valor mínimo de acidez titulable de 15 y máximo de 19 expresado como mL. de NaOH 1N/100mL de leche (Bracho

2013), pero, la adición de formaldehído incrementa la acidez debido a que reacciona con los grupos amino primarios y con los grupos guanidil tal como lo señalaron (Bajaj y Rai, 1983).

Posteriormente también se realizó la comparación de medias mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD), para la interacción actividad enzimática por pasteurización y por la adición de antimicrobianos: formaldehído y peróxido de hidrógeno y, en la Tabla 3 se puede observar la formación de grupos con promedios diferentes por ejemplo, la pasteurización señalada disminuye la actividad enzimática.

Tabla 3. Comparación de medias (LSD) para la diferencia significativa detectada en las interacciones: variables actividad enzimática (U/L) de las muestras de leche por Con/Sin pasteurización y por adición de antimicrobianos: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y formaldehído.

	Prom.	Grupos		Prom.	Grupos
Homogéneos					
Homogéneos					
Sin Pasteurizar	852,14	A	Control	907,88	A
Pasteurizado	423,48	..B	H ₂ O ₂	491,17	..B
			Formaldehido	109,38C

(LSD) Prueba mínima diferencia significativa. Fuente: Bracho, 2017.

Por otro lado la actividad enzimática del control es alta con respecto a la actividad enzimática cuando se adicionó peróxido de hidrógeno pero, el descenso que experimenta su valor promedio con la adición de formaldehído es violento y coincidente con lo reportado por Fabre *et al.*, (1962), Horne y Parker (1982) y Bracho (2017), quienes sostienen que el formaldehído tiene efecto inhibitorio sobre los sistemas enzimáticos.

Adición de formaldehído

El análisis de varianza de las variables acidez y actividad enzimática de la leche bovina adicionada con tres concentraciones de formaldehído: (1= 0,25%; 2= 0,25% y 3= 0,10%), antes y después de pasteurizar (Tabla 4), resultó muy significativa ($P > F$ 0,000) el efecto de las concentraciones de formaldehído para ambas variables lo cual se evidenció también en el análisis de la parcela principal, fortaleciendo el argumento que el formol produce cambios fuertes en la acidez de la leche y disminuye la actividad enzimática; potenciando esta acción cuando se somete a la temperatura de pasteurización.

Tabla 4. Análisis de varianza de las variables acidez (mL de NaOH 0,1N/100L) y actividad enzimática U/L de muestras de leche con adición de concentraciones de formaldehído: 1= 0,5%; 2= 0,25 % y 3= 0,10% antes y después de pasteurizar.

enzimática		Acidez			Actividad	
		GL	CM	F	P>F	CM
Fuente	P>F					
Concent. F		2	166,67	59,49	0,000**	1,596
34,20	0,000**					
Error (a)		21	2,8046		4666,6	
Pasteur.		1	4,100	7,30	0,0134**	5,743
123,06	0,000**					
Concent. F		2	0,0859	0,15	0,8591ns	1,596
34,20	0,000**					
X Pasteur.						
Error (b)		21	0,56176		4666,6	

****= Significativo 1%. *= significativo 5%. ns= no significativo.**

Concent.F= Concentración de formaldehído.

Fuente: Bracho, 2017.

La combinación concentraciones de formaldehído por pasteurización es no significativa para la acidez pero, muy significativa para la actividad enzimática, lo que demuestra que los valores de actividad enzimática varían más abruptamente en presencia del formaldehído.

La aplicación de pruebas posteriores se realizó comparando las medias (LSD) para la diferencia significativa detectada en las interacciones acidez de las muestras de leche por adición de la concentraciones de formaldehído indicadas antes y después de pasteurizar y se presenta en la Tabla 5. Tal como se observó en el análisis de la parcela principal, acidez es muy elevada, e inclusive para las tres concentraciones se sale de los límites establecidos en las Normas venezolanas e internacionales para leche cruda y pasteurizada, conformando tres grupos diferentes uno de otro con los valores promedios de la acidez de la leche.

Tabla 5. Comparación de medias (LSD) para la diferencia significativa detectada de las interacciones: variable acidez (mL de NaOH 0,1N/100L) de muestras de leche por adición de concentraciones de formaldehído 1= 0,5%; 2= 0,25 % y 3= 0,10% con/sin pasteurización.

Concent. Grupo	Promedio	Grupo	Promedio
Homogéneo			
Homogéneo			
1= 0,05%	28,89	A pasteurizado	26,16 A
2= 0,25% ..B	26,25	..B Sin Pasteur.	25,58
3=0,10%	22,47C	

(LSD) = Prueba mínima diferencia significativa. Fuente: Bracho, 2017.

Por otra parte el efecto de pasteurizar o no sobre los valores promedio de acidez de la leche con adición de formaldehído, hace dos grupos diferentes: pasteurizado y sin pasteurizar 26,26 y 25,58 mL NaOH 0,1N/100mL de leche respectivamente. También se hicieron las medias de actividad enzimática para las muestras de leche en la interacción detectada: adición de formaldehído en las concentraciones indicadas con y sin pasteurización y se puede observar en la Tabla 6, que el volumen de actividad enzimática con las diferentes concentraciones de formaldehído antes de

pasteurizar fueron: 58,98; 158,93 y 441,46 U/L respectivamente pero, al pasteurizar desaparece por completo.

Tabla 6. Medias de la variable volumen de actividad enzimática (U/L) de muestras de leche para la interacción detectada: adición de formaldehído en concentración de 1= 0,5%; 2= 0,25 % y 3= 0,10% con/sin pasteurización.

Combinación de concentración de Error estándar	Vol.Act. Enzimática+/-
Formaldehído Con/Sin Pasteur.	
1 = 0,5% Pasteurizado	0,00+/- 0,00
2= 0,25%	0,00+/-0,00
3= 0,10%	0,00+/-0,00
1= 0,5% Sin Pasteurizar	55,98+/-9287,0
2= 0,25%	150,93+/-2.19
3= 0,10%	441,46+/-1,65

Esto tiene una explicación química y bioquímica y se le atribuye a una desnaturalización por agente químico (formaldehído a 37%), asociado a la temperatura de pasteurización (60-63° C/30 min.) El formaldehído causa alteración de la estabilidad proteica ya que está constituido por metales de transición como el hierro y metales pesados, así como , residuos de ignición y al reaccionar con la leche, en presencia de calor, desestabiliza la proteína, cambia el pH,

modificándose la estructura conformacional la enzima LPO inactivándola completamente.

Adición de peróxido de hidrógeno

El análisis de varianza de la acidez y la actividad enzimática de la leche bovina con adición de tres concentraciones de peróxido de hidrógeno: (1= 0,06%; 2= 0,045% y 3= 0,03%) antes y después de pasteurizar, se resume en la Tabla 7. Dicho análisis resultó no significativo para la variable acidez en lo que respecta a concentración de peróxido de hidrógeno, pasteurización y la combinación de ambas fuentes de variación, lo cual demostró que no hay modificación de la acidez al ensayar los procesos indicados.

Tabla 7. Análisis de varianza de las variables acidez (mL de NaOH 0,1N/100L) y actividad enzimática U/L de muestras de leche con adición de tres concentraciones de peróxido de hidrógeno H₂O₂ (1 = 0,06%; 2 = 0,045% y 3 = 0,03%) antes y después de pasteurizar.

enzimática		Acidez			Actividad	
		GL	CM	F	P>F	CM
Fuente	P>F					
Con. H ₂ O ₂	10,03	2	0,3366	0,23	0,792ns	6,308
	0,009**					
Error (a)		21	1,43387		62906,02	
Pasteur.	0,00	1	1,03107	3,40	0,975ns	264,10
	0,950ns					
Con. H ₂ O ₂	0,10	2	0,0841	0,28	0,760ns	12104,4
	0,838ns					
X Pasteur.						
Error (b)		21	0,3036			

****= Significativo 1%. *= Significativo 5%. ns= no significativo**

Con.= Concentración. Fuente: Bracho, 2017.

Esto se comprobó al determinar las medias de la variable acidez en la combinación adición de concentraciones de peróxido de hidrógeno con y sin pasteurización (Tabla 8). Observándose valores muy parecidos y no existe interacción.

Tabla 8. Medias de la variable acidez (mL de NaOH 0,1N/100L) de muestras de leche en la combinación de adición de peróxido de hidrógeno H₂O₂ en concentraciones (1 = 0,06%; 2 = 0,045% y 3 = 0,03%) con y sin pasteurización.

Combinación de concentración de H₂ O₂ con /sin Pasteurizado	Promedio de acidez +/- Error estándar
1= 0,06 % Pasteurizado	16,20+/- 2,90
2= 0,045 %	16,58+/-8,08
3= 0,03%	16,45+/-5,93
1= 0,06 % Sin Pasteurizado	16,58+/- 4,04
2= 0,045 %	16,71+/-5,93
3= 0,03%	16,83+/-9,59

Fuente: Bracho, 2017.

Sobre la actividad enzimática se observa que hay diferencia significativa al 1% para la fuente de variación concentración de peróxido de hidrógeno, lo que deja ver que las diferentes concentraciones no tiene el mismo efecto aun cuando la pasteurización y la combinación concentración de

antimicrobiano y pasteurización, no son significativas y no causan variaciones mayores.

Se realizó prueba posterior de comparación de medias (LSD) a la variable actividad enzimática con las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y se presentan en la Tabla 9, donde se aprecia la formación de dos grupos de medias con idéntica letra, las cuales son similares al 5%; es decir, las concentraciones 0,03% y 0,045% dan valores promedios de actividad enzimática relativamente altos 675,57 y 524,40 U/L. respectivamente y la concentración 0,06% reportó un valor más bajo 281,96 U/L.

Se puede decir que el peróxido de hidrógeno a las concentraciones usadas no produce daño sobre la estructura química y bioquímica de la enzima LPO, así como también puede darse prioridad al uso de concentraciones de peróxido de hidrogeno que han dado valores de actividad enzimática más altos y consistentes, ya que la acidez se mantiene en el mínimo establecido en las normativas nacionales e internacionales

Tabla 9. Comparación de medias (LSD) para la diferencia significativa detectada en la interacción de la variable actividad enzimática U/L de muestras de leche por adición de peróxido de hidrógeno en concentraciones (1= 0,06%; 2= 0,045% y 3= 0,03%)

Concentración	Promedio	Grupos Homogéneos
3 = 0,03 %	675,57	A
2 =0,045 %	524,40	A
1 = 0,06 %	281,96	..B

LSD (prueba mínima diferencia significativa)

Grupo de medias con idéntica letra son similares al 5%. Fuente: Bracho, 2017.

CONCLUSIONES

El peróxido de hidrógeno H_2O_2 en las concentraciones usadas en este trabajo son excelentes para conservar la leche sin que se eleve la acidez y sin que se produzcan cambios químicos y bioquímicos en la estructura conformacional de la proteína, por lo cual son estables los valores de concentración de volumen de actividad de la LPO. Se puede aseverar que concentraciones por debajo de 0,06%, son más eficientes de acuerdo con estos resultados.

El uso de formaldehído en las concentraciones: 0,5 %; 0,25% y 0,10% tienen un efecto marcado sobre la acidez de la leche, elevando su valor por encima de lo establecido en la normativa venezolana e internacional vigente como materia prima para la industria. Por otra parte ejerce un marcado efecto negativo sobre el volumen de actividad enzimática de la LPO de la leche cruda y, cuando la leche adicionada de formaldehído se somete a pasteurización lenta (60-63 ° C), se anula por completo la actividad enzimática.

Tanto por el efecto sobre la acidez, como sobre el volumen de actividad enzimática resulta contraproducente el uso del formaldehído como aditivo antimicrobiano con fines de preservación de la leche para uso industrial, ya que en principio la elevación de la acidez, origina el rechazo al no cumplir con las normas industriales de calidad.

RECOMENDACIONES

Al quedar demostrado que el formaldehído, en concentraciones de: 0,5 ; 0,25 y 0,10%, tiene efectos contraproducentes sobre la acidez de la leche y sobre el volumen de actividad enzimática es importante que conjuntamente con los organismos competentes: Divisi3n de Higiene de Alimentos del Ministerio del Poder Popular para la Salud, el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” del gobierno de Venezuela y tambi3n en las normativas internacionales, se promueva una campaa para erradicar el uso que se pueda estar haciendo del formaldehído como preservativo en leche.

Aun cuando en Venezuela la reglamentaci3n vigente prohíbe el uso de per3xido de hidrógeno (H_2O_2) o agua oxigenada, cabe destacar que es un sustrato donador de electrones en la activaci3n del sistema lactoperoxidasa (SLPO), el cual es recomendado por el Comit3 mixto FAO/OMS para preservar leche en los países tropicales como Venezuela donde predominan, entre otras, las siguientes característicás de los sistemas de producci3n de leche:

La leche se produce en granjas dispersas, por lo general en pequeaa cantidades, y es preciso mezclarla y transportarla a lejanos centro de refrigeraci3n y procesamiento.

En muchos casos las vías de comunicación y medios de transporte no permiten que la leche llegue a los sitios de procesamiento o consumo con rapidez (menos de cuatro horas).

La temperatura ambiental asciende tanto en algunas épocas del año, que facilitan el rápido desarrollo de gérmenes y con ello la alteración de la leche, sin que existan medios de refrigeración adecuados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arias, Y. Salas, E. Romero, R. (2010). Efecto del peróxido de hidrógeno en la calidad fisicoquímica de la leche cruda de vaca. Rev.Unell.Cienc.Tec. (Vol. especial). 52 -57 pp.

Bajaj, V.W. and Rai, T, 1993. Effect of formalin on comparative efficiency of protein and lactose estimation. Indian J.Sci 46.1: 21-25.

Bracho, H. (2013). “Ciencia y tecnología de la leche, Composición y características” 2da Edición. Editorial Académica Española. (EAE) Publishing. Madrid. MoreBook. 124 PP.

Bracho H. 2017. Industrialización de la Leche. Productos y subproductos lácteos. Tercera Edición Editorial De La Parra, KDP-Amazon ISBN 978-990-12-9269-2. USA. 200p.

C.F.R. 1984. Code of Federal Regulations Food and Drugs, 21 CFR 170.3. US Government Printing Office, Washington, D.C.

Comisión Venezolana de Normas Industriales. (COVENIN). 1979. Norma 1315. Alimento determinación de pH. Ministerio de fomento. Caracas, Venezuela.

Comisión Venezolana de Normas Industriales. (COVENIN). 1993. Norma 903 Leche cruda. Ministerio de fomento. Caracas, Venezuela.

Comisión Venezolana de Normas Industriales. (COVENIN). 1997. Norma 658. Leche y sus derivados determinación de acidez titulable. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela.

Fabre, R.; Truhaut, R.; Granier-Doyeux, M. 1962. Compendio de toxicología. Tomo I Ediciones Biblioteca UCV-Caracas. Pp. 328-331.

F.A.O. 1957. . Report on the meeting of experts on the use of hydrogen peroxide and other preservatives in milk, Rome, Doc. 57/11/8655.

FAO & FEPALE. 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Federación Panamericana de la Leche. Situación de la Lechería en América Latina y el Caribe en 2011.

Horne, D.S. & Parker T. 1982 Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. Effect of chemical modification of milk protein Dairy Sci. 49: 449-497.

Observatorio de la Cadena Lechera. 2012. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. División de Producción y Sanidad animal.

I.D.F. 1988. Código de práctica para preservación de leche fresca a través del Sistema Lactoperoxidasa. Boletín del Diario Federación Internacional de la Leche. No. 234: 3-5.

Kamau, D.; Doores, S. and Pruitt, K. 1990. Antibacterial activity of the Lactoperoxidase System against *Listeria monocitogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. Journal Food Protection; 53: 1010A-1014. U.S.A.

López-Alcaide N. 1986. Persistencia del agua oxigenada en leche cruda y eficacia de algunos métodos usados para su detección. Trabajo de Ascenso. Facultad de Ciencias Veterinarias UCV. Maracay, Venezuela 62 p.

Manson-Rahemtulla, B; Rahemtulla, F; Baldone, D; Pruitt, K.M; Hierpe, A.1988. Purification and characterization of human salivary peroxidase, *Biochemistry*, 27,233-9.

Martinez, G. A. 1988. *Diseño Experimental, Métodos y Elementos de Teoría* Editorial Trilla, S.A. de C.U. México.

Observatorio de la Cadena Lechera. 2012. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. División de Producción y Sanidad Animal.

Pruitt, K.M. and Kamau, D.N. 1991. The lactoperoxidase system of bovine and human milk. In *oxidative enzymes in food*. Edited by Robinson, D.S. and Skim N.A.M Elsevier Science Publishers LTD Crown house Linton Road. Barking, Essex JG11 JU, Engalnd.

Putter, J. 1974. Peroxidase. In *Methods of analysis enzymatic*. Vol. Two, Second Edition. Edited by Hans Ulrich Bergmeyer. Academic Press. Inc.

Reiter, B. 1985. The lactoperoxidase system of bovine in the Lactoperoxidase. System Ed. K. M. Pruitt and Tenovuo, J. O. Marcel Dekker, New York; 60: 123-141.

Robinson, D.S. 1991. Peroxidases and catalases in food. Chapter 1. In *oxidative enzymes in food*. Edited by Robinson and Skin N.A.M: Elsevier Sciences Publishers LTD. pp. 1-47.

Shahanni, K.M; 1966. Milk Enzymes: Their role and significance. *Dairy sci* 49 (8): 907-920.

STATISTIX Versión 4.0 (C) 1985-1992) Analytical Software.

Taher, M.Y; Lakshmaiah, N.1992. Folic acid stability in hydrogen peroxide-potassium thiocyanate treated milk. Food Chemistry 44: 343-347.

Webb, B; Johnson, A; Alford, J. 1974. Fundamentals of Dairy Chemistry. Two ed. Ed. Avi Westport U.S.A.

III

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL PROCESO INFLAMATORIO DE LA UBRE (MASTITIS) DE CABRAS Y VACAS POR EFECTO DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA (SLPO) EN INFUSIÓN INTRAMAMRIA

INTRODUCCIÓN

El sistema lactoperoxidasa (SLPO) es un mecanismo natural de defensa de la glándula mamaria y es activo en todos los mamíferos incluyendo el hombre. Ha sido demostrado como agente bactericida/bacteriostático frente a microorganismos patógenos Gram positivos y Gram negativos que producen la mastitis.

Las ventajas de la aplicación del SLPO resultan evidentes porque permite una terapia de control de mastitis en cabras secas y en producción, mejora la calidad de la leche, aumenta la producción de leche por cabra, contribuye a estabilizar los precios de la leche y además incrementa la calidad de los derivados lácteos.

La mastitis ha sido señalada como una causa del déficit de la producción de leche, ya que es una de las enfermedades más costosas en el ganado lechero, costos que por lo general no son reconocidos, sin embargo son reales y afectan las ganancias netas del productor. Además ésta no sólo provoca disminución del valor nutritivo de la leche, sino que causa importantes efectos en la salud humana como la transmisión de microorganismos patógenos que pueden provocar enfermedades en el hombre.

Se ha demostrado que el sistema lactoperoxidasa no representa peligro para la salud humana siempre que se use en concentraciones establecidas en las normas internacionales. Por lo tanto, este trabajo de investigación tuvo como fin evaluar el comportamiento del proceso inflamatorio de la ubre de cabras por activación del sistema lactoperoxidasa

ASPECTOS TEÓRICOS

La enzima lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa es una de las principales enzimas proteicas de la leche encontrándose en concentraciones medias de 30mg/L, muy superiores a las necesidades biológicas requeridas para una óptima reacción enzimática. (Björck *et al.*, 1975, Así mismo, pertenece al grupo de las oxidorreductasas, y es responsable de la fase bactericida y bacteriostática durante las primeras horas que se siguen al ordeño (Bracho, 2004).

El Tiocianato

El tiocianato es un ion ampliamente distribuido en todos los fluidos biológicos de los mamíferos como resultado del metabolismo hepático de los glucósidos y aminoácidos azufrados, reportándose gran variabilidad en la leche, en dependencia de la dieta, factores fisiológicos y raciales (Bracho, 1994).

El tiocianato de sodio es un componente natural de la leche cuya función es la de actuar como inductores de la actividad enzimática y al producir iones de tiocianato reaccionan con componentes específicos de la pared celular de los microorganismos, produciendo una acción bactericida o bacteriostática en la leche recién ordeñada.

El Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente oxidante con efecto bactericida contra *E. coli* a concentraciones de 10 – 20 mM. En cambio, sólo se necesitan concentraciones de 0.01 – 0.02 mM para catalizar la oxidación del ion tiocianato, bromuro o yoduro por el sistema lactoperoxidasa (Reiter, 1984). Asimismo este autor cita que la leche no contiene peróxido de hidrógeno, ya que las cantidades del orden de nano moles generadas por los leucocitos polimorfonucleares y difundidas a la leche son rápidamente inactivadas por acción de la catalasa y peroxidasa.

La adición de concentraciones de tiocianato y peróxido de hidrógeno en proporción con la enzima lactoperoxidasa existente en la leche cruda de cabras, produce un retardo en la acidificación y la inhibición de microorganismos, por lo tanto, mejorando el manejo de leche de cabra a temperatura ambiente (Bracho, 2004).

El Sistema Lactoperoxidasa (SLPO)

El sistema lactoperoxidasa se encuentra de forma natural en la leche de todos los mamíferos, como parte de los mecanismos intrínsecos para la conservación y protección de las crías así como en otros fluidos biológicos como la sangre, saliva, jugo gástrico, linfa y orina. (Bracho, 2004). En la leche la concentración o volumen de actividad enzimática registra variaciones por lactancia o partos, período de lactancia, en el calostro y por la dieta (Bracho, 1994).

El sistema Lactoperoxidasa (SLPO) está compuesto por la enzima lactoperoxidasa en concentraciones de 30 g/ mol de leche, tiocianato de 0.02 – 0.025 mg/l y peróxido de hidrógeno 0.4 nM, cuyas fuentes en la leche puede ser por vía enzimática mediante el sistema glucosa/ glucosa oxidasa, por acción microbiana de *Lactobacilos* en el abomaso y por adicción directa (Mullan *et al.*, 1980). El peróxido de hidrógeno puede ser adicionado en diferentes concentraciones, seleccionando la de mejor efectividad y en cuanto al volumen de actividad enzimática (Bracho, 1994; FAO-OMS, 2005)

Aplicaciones tecnológicas

El efecto antimicrobiano ha sido ampliamente demostrado y el SLPO se ha comprobado como un agente bactericida/ bacteriostático frente a diferentes grupos de microorganismos

como bacterias patógenas y esporulados, virus, micoplasmas, levaduras, hongos, parásitos (Jacob *et al.*, 2000; Ragurtol y Torres 2012; CIEPE-INN-Venezuela 2014). Esto r concuerda con lo reportado por Marshall *et al.* (1986), cuyos experimentos mostraron que las secreciones de las glándulas mamarias recogidas 14 días antes y 7 días después del secado, así como tras el parto, inhibían el crecimiento de *Streptococcus uberis*. Sin embargo, las secreciones recogidas 21 días después del secado no eran inhibitorias frente a este microorganismo. Parece que el sistema lactoperoxidasa juega un papel, en vivo, a la hora de proteger la glándula mamaria lactante de la infección por *Streptococcus uberis*, volviéndose ineficaz cuando ésta involuciona. El sistema lactoperoxidasa se ha mostrado efectivo contra *Streptococcus agalactiae*, patógeno que produce mastitis (Mickelson, 1976; Meneses 2009).

Los microorganismos Gram negativos y catalasa positiva mueren en presencia del sistema lactoperoxidasa, si el peróxido de hidrógeno se suministra química o enzimáticamente. Esta acción bactericida depende del pH del medio, del tiempo de incubación y de la temperatura (Björck *et al.*, 1975).

Se ha establecido que la lactoperoxidasa y los sustratos activadores no representan peligro para la salud humana

siempre que se use en concentraciones establecidas en las normas internacionales (Kamau y Pruitt, 1991).

El SLPO es promocionado por la FAO como medio efectivo de extensión de la vida de almacenamiento de la leche cruda en los países en vías de desarrollo, donde razones técnicas, económicas y/o prácticas no permiten el uso de facilidades de enfriamiento para el mantenimiento de la calidad de la leche cruda. El uso del sistema lactoperoxidasa en áreas en las cuales falta actualmente una adecuada infraestructura para la recolección de leche líquida, aseguraría la producción de leche como un producto alimentario completo y saludable, que de otra manera hubiera sido virtualmente imposible (Zapico, 1993; Bracho, 2004; FAO y OMS, 2005).

Características de la mastitis en vacas y cabras

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, caracterizada por cambios físicos y químicos de la leche y por alteraciones patológicas del epitelio glandular. Es el resultado de la interacción de varios factores tales como: manejo e higiene de los animales durante el ordeño, susceptibilidad, características ambientales, asociados a la presencia de microorganismos (Castro *et al.*, 2006; Bedolla *et al.*, 2012).

Es una enfermedad infecciosa contagiosa causada por agentes bacterianos diversos, virus y hongos que inflaman la ubre y ocasionan hinchazón, calor, dolor y congestión del tejido mamario, además se acompaña de alteración en la cantidad, textura y composición de la leche y apareciendo elementos extraños tales como: sangre y pus que originan cambios en el color y producción de la misma. (Philpot, 1999). Más del 95 % de los cuadros de mastitis clínica y subclínica son causados sólo por un pequeño grupo de bacterias contagiosas, entre ellas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*.

Sánchez *et al.* (1999); Bedolla, (2016); Jiménez, *et al.*, (2016) mencionan que la falta de adiestramiento de los ordeñadores incide en la presentación de la enfermedad; además citan que el orden del ordeño no se puede realizar como en la vaca, ya que su ejecución presenta dificultades debido a que la mayoría de los animales se encuentran en el mismo lote.

La mastitis es ocasionada por organismos microscópicos que penetran la ubre a través del orificio del pezón. La penetración puede ocurrir por multiplicación, movimiento mecánico, propulsión durante el ordeño o por una combinación de factores (Pinzón, 1989; Pyorala 2011). Así mismo, ha sido

señalada como una causa de la deficiencia de la producción de leche y también una de las más subestimadas. Es una de las enfermedades más costosas en el ganado lechero, por las pérdidas que por lo general no son reconocidas; sin embargo, son reales y afectan las ganancias netas del productor (Ávila *et al.*, 1993; Básicos Lecheros 2014).

La mastitis es el problema fundamental de la industria láctea en el mundo, debido a los cambios que provoca en el valor nutritivo de la leche y sus derivados por disminución del contenido en lactosa, caseína, grasa y, además un aumento de elementos no deseables como lipasa, cloruros, con la consiguiente afectación en el proceso de elaboración de derivados lácteos, lo que se traduce en mermas en la producción y calidad de la leche y sus derivados Zecconi, (2000); Cruz, (2015) y Peña, (2016).

La mastitis no solo provoca disminución del valor nutritivo de la leche, pues la enfermedad posee importantes efectos en la salud humana, como: transmisión de microorganismos patógenos que pueden provocar enfermedades en el hombre: endocarditis, meningoencefalitis, enteritis y artritis así como los riesgos relacionados con la presencia de antimicrobianos en la leche, que pueden ocasionar reacciones alérgicas y resistencia a las drogas utilizadas. (Calvinho, 1992; Escobar, 2010).

La mastitis es una de las enfermedades de mayor impacto económico para la actividad lechera, especialmente la subclínica, que transcurre desapercibida en la mayoría de los casos, por lo menos un 70 % de las pérdidas económicas se expresan en mermas en producción de leche y eliminación de la leche procedente de animales enfermos.

La mastitis subclínica es difícil de detectar, dado que la enfermedad transcurre sin provocar una inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos de la leche, pero sí afecta su calidad fisicoquímica. Para la confirmación del diagnóstico se requieren análisis de laboratorio y de calidad de la leche que detecten la presencia de microorganismos causantes o el recuento de células somáticas en el fluido lácteo (Philpot, 1999).

Método de diagnóstico de la mastitis:

La reacción inflamatoria dentro de la glándula se descubre solamente por medio de pruebas como California Mastitis Test (CMT), la de Wisconsin y los contadores celulares electrónicos, los cuales se emplean a intervalos para determinar los recuentos celulares somáticos de la leche (Merck, 2000).

El CMT es una prueba de campo económica, sencilla y rápida, que detecta con buena sensibilidad y especificidad el estado de salud de la ubre, mediante una estimación gruesa el contenido de células somáticas. En Venezuela, la prueba ha sido evaluada y ampliamente recomendada como una herramienta útil en los programas de control y vigilancia de mastitis, especialmente cuando se aplica y registra cada mes. Su principal desventaja es subjetividad implicada en la lectura de los resultados (Scaramelli y González, 2005).

El método CMT en leche de cabra, en general de ubres no infectadas rendirán una reacción 0, trazas o una cruz; mientras que la reacción 2 o 3 cruces son representativas de mastitis. Los valores están relacionados ampliamente con el número de células somáticas en la leche tendiendo a incrementarse durante el ordeño y permanecer alto poco tiempo después. Para confiar en esos resultados (CMT cabras) debería ser realizada justo antes del ordeño después del descarte de los dos primeros chorros (Harris, 1993; Escobar 2010).

El uso del CMT en el rebaño entero a intervalos mensuales puede ser muy útil en la detección de mastitis subclínica. Las infecciones por cuartos individuales y totales pueden ser determinadas y con los registros, vigilar la prevalencia. Esta prueba rinde la información que puede ayudar para la determinación de procedimientos o de la función del equipo de

ordeño defectuoso, la eficacia del sellado del pezón y de los programas de secado de vacas (Rice, 1999).

Interpretación de la prueba California Mastitis Test (CMT):

Contreras (1992) cita que una vez que se aplica esta prueba, los resultados se pueden interpretar de la siguiente manera:

Negativo: la muestra se conserva líquida, pero sin indicio de formación de precipitado alguno. Rango es de: 0 – 200.000 Leucocitos/m.; 0 – 25% de polimorfonucleares.

Trazas: se forma un leve precipitado. La reacción tiende a desaparecer al movimiento del líquido. Rango es de: 150.000 – 500.000 Leucocitos/m.; 30 – 10% de polimorfonucleares.

+ Débil: se forma en precipitado definido sin tendencia a formación de gel al continuar moviendo la paleta, el precipitado puede desaparecer. Rango es de: 400.00 – 1.500.000 Leucocitos/m.; 40 – 60% de polimorfonucleares.

Claramente ++: la mezcla se espesa inmediatamente con algún asomo de formación de gel. A medida que se hace girar la mezcla, el gel tiende a desaparecer hacia el centro dejando descubierto el fondo del borde exterior de taza. Cuando cesa el movimiento, la mezcla se nivela y cubre el fondo de la taza.

Rango es de: 800.000 – 5.000.000 Leucocitos/m.; 60 – 70% de polimorfonucleares.

Fuertemente +++: se forma un gel que hace que la superficie se ponga convexa. La viscosidad es bastante evidente y la masa se adhiere al fondo de la taza. Rango es más de 5.000.000 Leucocitos/m.

El número de células somáticas en la leche, indicativo de respuesta inflamatoria, se encuentra elevado al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de secreción láctea, así como la alteración de la composición de dicho producto.

Una explotación con un bajo Contaje de Células Somáticas (CCS) es una explotación libre de problemas, ya que en muchas ocasiones la leche procedente de las mastitis clínicas no va a tanque. Por esta razón además del CCS como indicador de los procesos subclínicos, hay que realizar un seguimiento de los procesos clínicos, anotándolos y diagnosticándolos. Por ejemplo, una explotación con un CCS medio de 300.000 leucocitos/m. Pudiera tener un grave problema de mastitis gangrenosa por *Staphylococcus aureus* (Aparicio y Pérez, 2001).

Tratamientos de la mastitis:

El tratamiento químico terapéutico se recomienda usarlo en casos de mastitis clínica sobreaguda, aguda o subaguda, y en los casos recientes o crónicos. El fármaco ideal para el tratamiento de la mastitis subclínica deberá tener un espectro apropiado, alcanzar concentraciones antimicrobianas sin afectar otros sistemas, ser altamente liposoluble y unirse poco a proteínas plasmáticas. La terapia con antibióticos se basa principalmente en el uso de antibióticos β – lactámicos como la penicilina y las cefalosporinas (Castro *et al.*, 2006).

La influencia de la mastitis sobre la composición de la leche sugiere medidas preventivas. La producción de leche de alta calidad y de un alto patrón de higiene depende de un sistema de manejo donde la calidad es producto de la seguridad del mismo (Heeschen, 1995).

Una rutina higiénica simple y efectiva, de por sí, influye positivamente en la calidad microbiológica de la leche cruda. La ordeñadora es una gran fuente de contaminación, mientras que con el ordeño manual se obtiene a menudo un producto de un nivel microbiológico superior, siempre que el animal y el ordeñador estén sanos. El área de ordeño tiene que estar en lo posible libre de excrementos. Se recomienda el lavado de la ubre y el secado con una toalla de papel (Prinsloo *et al.*, 1999).

El impacto económico de la mastitis incluye pérdidas en producción de leche, alteración funcional de la ubre, costos en terapia y posible muerte de la hembra; además, de su significación desde el punto de vista de salud pública, sobre todo en aquellos países donde se consume leche no pasteurizada, por poseer ciertos microorganismos potencialmente dañinos al humano (Stehling *et al.*, 1986; Kundel *et al.*, 1987; Parker, 1988; Harris, 1993).

Está comprobado tanto en vacas como en cabras, que la presentación subclínica de la enfermedad, produce el 80% de las pérdidas económicas, (Dobbins, 1977; Haelein, 1987) y de estas el 70% obedece a una reducción con la producción de leche (Kobayashi, 1978; Blosser, 1979; Kirk, 1981; Vihan y Sahani, 1987; Haelein, 1987).

En el diagnóstico de mastitis subclínica se presenta serias dificultades, cuando se compara con la forma clínicas (Smith y Roguiky, 1977; Vihan y Sahani, 1987), ello ha creado la necesidad de utilizar algunas pruebas indirectas capaces de detectar cambios inflamatorios de la ubre, alteraciones en la composición de la leche tales como pruebas de pH, California, Mastitis Test (CMT) Wisconsin mastitis test, conteo de células

somáticas, método eléctrico y el método directo (bacteriológico) (Zemelman *et al.*, 1966, Gebre-Eigziabher, *et al.*, 1979).

Para el diagnóstico de mastitis subclínica, no obstante, se ha basado en el aislamiento de microorganismos en la leche, sin embargo éste método requiere personal entrenado, tiempo y dinero (Lerondelle y Poutrel, 1983; Maisi y Ripian, 1988).

East *et al.*, (1987), citan una prevalencia de infección intramamaria por rebaño entre 8.3% a 54% donde la más baja prevalencia de 8% a 20% corresponden a un rebaño ordeñado a máquina y otro manual, pero con buenas prácticas sanitarias, mientras que en los rebaños con ordeño manual y ninguna práctica sanitaria la prevalencia de infección intramamaria osciló entre 30% a 54,5% y las bacterias aisladas con mayor prevalencia fueron *Staphylococcus* coagulasa – negativos. Además *Staphylococcus aureus* estuvo presente en 10 de 16 de rebaños y los *Streptococos dysgalactie, uberis, zooepidemicus* en 1% de las muestras.

Según Poutrel (1984) se clasifica los *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados por especies, sin embargo aproximadamente un 10% de las cepas no pudieron ser identificadas aplicando una simple técnica y *Staphylococcus epidermidis* es la única especie considerada por otros estudios

(Mellengerger, 1979; Pettersen, 1981), encontrándose en un 50% de todo los *Staphylococcus caprae* una nueva especie descrita recientemente.

Una posible explicación de los variados reportes en cuanto a las patogenicidad de *Staphylococcus* coagulasa negativa, es debida a que este grupo de bacterias, actualmente contiene muchas especies, algunos de los cuales pueden ser más patógenos que otros y en este grupo está *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hilvicus*, *Staphylococcus simulan* y *Staphylococcus caprae* (Lerondelle y Poutrel, 1984).

El *Staphylococcus aureus* se describe como una especie de cocos Gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la glucosa con producción de gas. Las características comunes que han permitido el aislamiento de *Staphylococcus* de otros géneros son: la capacidad de crecer en presencia de concentraciones específicas de agentes selectivos tóxicos, la apariencia de las colonias en el medio selectivo y la capacidad de producir ácido a partir del manitol.

Las características que han permitido diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies del género *Staphylococcus* son: su habilidad de hidrolizar la yema de huevo, la producción de una termonucleasa que hidroliza el

ADN, producción de hemolisina gelatinosa y una coagulasa, así como también , la presencia de ácido tectónico A en la pared celular. Según Valle, *et al.*, (1990), el *Staphylococcus aureus* se encuentra principalmente en piel y mucosas del hombre y de los animales. Pueden producir coagulasa e inclusive provocar intoxicaciones debido a que produce una enterotoxina termoestable.

Es potencialmente patógeno y produce gran variedad de infecciones e intoxicaciones alimentarias cuando aumenta la contaminación de alimentos destinados al consumo humano. La presencia del *Staphylococcus* spp es un riesgo potencial para la salud humana, debido a que la enterotoxina estafilocócica es causante de intoxicaciones alimentarias.

El tratamiento de las infecciones subclínicas puede hacerse durante la lactancia, su realización en el momento del secado es más ventajoso porque se puede usar una dosis más alta de antibióticos con una mayor margen de seguridad, la droga es retenida en la ubre durante un período más largo, la tasa de curación es mayor y el riesgo de contaminar la leche con residuos antibióticos es menor. La terapia vaca seca es una parte integral de los programas de control de mastitis desde hace 30 años (Tarabla *et al.*, 1999).

La espiramicina logra una buena distribución en la glándula, ya sea administrada por vía intramamaria o parenteral, mientras que la neomicina es el antibiótico más utilizado en combinaciones de drogas debido a su amplio espectro antibacteriano. Ambas drogas tiene una alta afinidad por las proteínas del tejido mamario y una baja tasa de absorción, lo que explica en parte su permanencia relativamente prolongada en la glándula (Tarabla *et al.*, 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica del área de estudio

Las muestras utilizadas para el estudio fueron tomadas en unidades de producción semi intensiva, municipio Colina del estado Falcón. Latitud: 11.3987°. Longitud: 69.6147°. Altitud: 30 msnm.

Características Agroecológicas

El área de estudio está ubicada en la Zona de Vida Bosque muy Seco Tropical, con características que lo ubican en la provincia humedad semiárida, con las siguientes características climáticas: promedios anuales de precipitación entre 500 y 1000 mm, con promedios de precipitación muy altos que exceden a la precipitación. Las lluvias en esta provincia ocurren en forma de fuertes aguaceros que

contribuyen a la erosión muy extendida. En relación a la vegetación de esta zona de vida consiste en un bosque de dos estratos con alturas entre 8 y 18 metros, cuyos representantes están compuestos principalmente por los siguientes géneros: *Capparis*, *Bulnesia* sp (vera), *Platymiscium*, *Phitecelobium*, *Tabebuia*, y entre árboles se encuentran dispersos Cactáceas columnares y arbustos menores como *Jatropha* (picapica), *Lonchocarpus* y acacias (Ewel y Madriz, 1968).

Según COPLANARH (1975), esta unidad de tierras (H-122), corresponde a la planicie del Río Coro, con relieves planos (entre 0-1%), pertenecientes originalmente a la geomorfología de la planicie de desborde de Río Seco del pleistoceno superior. El uso actual de la tierra es con cultivos hortícola y frutales bajo riego, permaneciendo gran parte de la vegetación natural xerofítica ociosa, se aprovecha para la explotación caprina extensiva y no controlada. Los suelos pertenecen al grupo de Carborthids medios, profundos de texturas medias, bajo contenido de materia orgánica y moderadamente alcalinos.

Población y muestra

En esta investigación se evaluó un rebaño de cabras, sin patrón racial definido en producción en una explotación semi-intensiva, ubicada en el municipio Colina del estado Falcón. Se seleccionaron 41 cabras; con períodos de lactancia entre 3 y 6

meses, en donde se realiza un ordeño manual/día, alimentándose a pastoreo además de alimento concentrado; en dicha unidad de producción no se aplica ningún tipo de práctica higiénico- sanitario, antes, durante o después del ordeño.

Análisis Estadístico

Se procedió a la utilización de métodos estadísticos no paramétricos, ya que los datos solo se pueden clasificar en categoría de escala nominal (casos). Estas pruebas no paramétricas son aquellas cuyo modelo no especifica las condiciones de los parámetros de la población de la cual se obtuvo la muestra, es decir es imposible especificar la forma de la distribución poblacional (Bravo, 1992).

Se utilizó el paquete estadístico “INFOSTAB” de Windows, para realizar las pruebas correspondientes con la Prueba de Wilcoxon (muestras pareadas) a fin de establecer variación de los signos y síntomas del proceso inflamatorio de la ubre.

Fase de campo

Recolección de muestra

Se tomaron muestras de leche para cultivo bacteriológico provenientes cabras que resultaron positivo a dos y tres cruces al CMT al recolectar la leche en el ordeño de la mañana como lo describe Wolter *et al.* (2003), efectuándose lavado de los pezones con agua de chorro luego se procedió a la

desinfección con alcohol al 70% y previa eliminación de los primeros chorros de leche. Posteriormente se recolectaron las muestras de leche de cada mitad de la ubre en recipientes para muestras de orina debidamente identificados con el número del animal y la mitad de ubre respectiva derecha e izquierda. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas inmediatamente al laboratorio.

Prueba California de Mastitis (CMT)

Esta prueba se realizó antes del ordeño de la mañana, en donde se tomaron muestras de leche por pezones individuales siguiendo el procedimiento señalado por Martínez (2004). Se utilizó una paleta plástica específica para la prueba y el reactivo (alkilaril sulfonato de sodio y un indicador de pH, el púrpura de bromocresol) identificando los medios de la ubre como derecho e izquierdo; descartando los primeros chorros de leche depositando cierta cantidad en la paleta y colocando la misma en posición casi vertical para enrasar dejando aproximadamente 2 cc de leche y luego añadiendo 2cc de reactivo diluido 1:7 en cada compartimiento. Luego se procedió a dar movimientos circulares cortos y realizar la lectura e interpretarla según la Tabla 1 establecida por Wolter *et al.* (2003).

Tabla 1. Interpretación de la prueba del california mastitis test (CMT)

CMT	TIPO DE REACCION
Negativo	Mezcla permanece líquida
Trazas	Ligeramente viscosa
1+	Mezcla viscosa
2+	Viscosidad franca
3+	Gel adherido al fondo

Fuente: Wolter *et al.* (2003).

Fase de laboratorio

El procesamiento de las muestras para cultivo bacteriológico se llevó a cabo en el Laboratorio Clínico Bacteriológico MICBIOLAB, y la activación del Sistema Lactoperoxidasa (SLPO) se realizó en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos del CITEC- UNEFM.

Diagnóstico bacteriológico

El procedimiento de siembra se realizó siguiendo los criterios propuestos por Brown *et al.* (1969), I.D.F. (1981), Poutrel y Reinard, (1981) en donde se utilizó un asa de platino calibrada, que permitió tomar un volumen aproximado de la muestra de 0,01 ml; el cual se inoculó por agotamiento sobre placas de Petri contentivas de los medios de cultivo agar McConkey, agar Manitol, agar sangre y agar Levine.

Luego fueron sometidos a incubación a 37°C, en atmósfera de CO₂ por un período de 24 a 48 horas, transcurrido el tiempo se procedió a verificar el crecimiento bacteriano y caracterizando microscópicamente las colonias presentes y proceder a la identificación inicial de los microorganismos aplicando los siguientes criterios: Características de la colonia. Características morfológicas y tintoriales observadas al examen microscópico mediante frotis coloreados por la técnica de Gram. Prueba de oxidasa. Prueba de catalasa, obtenida al colocar una pequeña porción de colonia frente a una gota de peróxido de hidrógeno al 3% (Brown *et al.*, 1969; I.D.F., 1981). Luego de este procedimiento se efectuaron pruebas bioquímicas con la finalidad de identificar género de microorganismos. Utilizando técnicas descritas (Björck *et al.*, 1975; I.D.F. 1981; Adegoke y Oyo, 1982).

Identificación del Género *Staphylococcus*: Prueba de coagulasa en tubo

Identificación del Género *Enterobacter*: Citrato de Simmons, Triple Sugar Iron TSI, motilidad.

Identificación del Género *Escherichia*: Triple Sugar Iron (TSI)

Identificación del Género *Bacillus*: morfología, técnica de Gram.

Proceso de activación del sistema LPO

El control de factores se realizó en la leche de cabras y de vacas negativa a mastitis, para luego realizar el proceso de activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO):

Determinación de la acidez titulable (COVENIN No. 658-97)

Determinación de pH: Método Instrumental.

Determinación Cualitativa de lactoperoxidasa: Método de Arnold

- Se usa una solución de guayacol al 10% en acetona (preparada 2 – 3 días antes de su empleo).
- Se coloca con una pipeta 10 ml de la muestra preparada en un tubo de ensayo.
- Se adicionan 2 – 3 gotas de solución de H₂O₂ al 3%.
- Se colocan 8 gotas de solución de guayacol al 10 % por las paredes.

- La formación de una banda color rojizo en la zona de contacto es el indicativo de la presencia de peroxidasa.

Determinación cuantitativa de la enzima LPO

Se usó el método de Pütter (1974), en el cual se utiliza un Buffer fosfato (0,1 m; pH 7) compuesto de fosfato de potasio monobásico (HM_2PO_4) y dibásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$) además solución de guayacol (20.1 mM) y solución de peróxido de hidrógeno (12.3 mM).

Se introduce en una cubeta 3 ml de Buffer fosfato (0,1 m); 0,05 ml de solución de guayacol (0.3 mM), 0.10 ml de muestra de leche y 0.03 ml de solución de peróxido de hidrógeno (0,1 mM).

Se agita y se deja reaccionar dos (02) minutos a 25 ° C (Linden *et al.*, 1982). Se realiza la lectura de la extinción de la solución en el espectrofotómetro a 436 nm de longitud de onda.

Fórmula para la determinación del volumen de actividad de la LPO:

$$\text{Vol. Actividad} = \frac{V}{\text{ml.}} \times \text{AE} \times 1000$$
$$E \times d \text{ AT} \times 0,1$$

V= Volumen de solución en la celda del espectronic.

AE= Cambio de densidad óptica medido (Absorbancia).

E= Coeficiente de extinción de Guayacol (435nm= 639 Cm²/μmol).

d= distancia de 1 cm. (paso de luz en la cubeta).

AT= Tiempo requerido para la reacción (2 minutos).

0,1= Coeficiente de incremento de extinción.

1000= Conversión a litro.

El resultado se expresa en unidades enzimáticas por ml de leche (U/ml).

Determinación de tiocianato en leche:

- 10 ml de leche
- 10 ml de ácido tricloroacético al 20 %
- La mezcla se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Filtrar el supernadante en papel filtro Whatman No. 2.
- Un milímetro de filtrado se adiciona a 5 ml de reactivo sorbo (10 gr. de Fe (NO₃)₃.9H₂O disueltos en 200 ml de HNO₃ y se lleva a un litro de agua destilada, se deja la mezcla en reposo por 4 minutos y se mide la absorbancia a 460nm.
- La curva de calibración es hecha con una solución de tiocianato estandarizado.

Activación del sistema lactoperoxidasa (SLPO) en leche

La activación del sistema LPO se hizo en muestras de leche de cabra y de vaca negativa a mastitis, éstas se tomaron en condiciones asépticas a fin de aplicar la infusión intramamaria del sistema LPO a las cabras y vacas a tratar. Se usaron envases de vidrio estériles para activar el sistema LPO. Se usó 0.06% de H₂O₂, (Bracho, 2004), 15 y 30 ppm de tiocianato de potasio (I.D.F, 1988), éstas se adicionaron en 150 ml de leche fresca con una acidez de 17 ml NaOH 0.1 N/10 en ml de muestra y con pH de 6,8. Para las dos concentraciones de tiocianato se adicionaron 3 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para la de 15 ppm, se adicionó 0.00225 gr. de tiocianato de potasio y para la de 30 ppm se le agregó 0.0045 de tiocianato de potasio.

Aplicación de la infusión intramamaria en cabras y vacas.

Se realizó una sola aplicación de la infusión intramamaria a 36 mitades de ubre en el caso de cabras, así como, en cuartos de la ubre de vacas, después del ordeño de la mañana, pertenecientes a cabras y vacas que resultaron positivos, a la prueba CMT con dos y tres cruces. A los animales con mitades o cuartos de ubre positivas con dos cruces a la prueba CMT se les aplicó una concentración de peróxido de hidrógeno de 0,06% y una de 15 ppm de tiocianato de potasio, y para las mitades de ubre con tres cruces se utilizó una concentración de

peróxido de hidrógeno de 0,06% y una de 30 ppm de tiocianato de potasio (Bracho, 2004). Para la aplicación de la infusión se utilizaron sondas intramamarias estériles número 16 con inyectoras desechables de 10 ml (dosis única), por cada mitad o cuarto de ubre diagnosticado con mastitis sub – clínica; luego de aplicada la terapia química se realizó un masaje al pezón de abajo hacia arriba para distribuir mejor la infusión.

Evaluación post aplicación de la infusión intramamaria en cabras y vacas

Siete días después de la aplicación de la infusión intramamaria del sistema LPO, se evaluó el grado de inflamación de las ubres de cabras y vacas, a través de la prueba de CMT y cultivo bacteriológico, para verificar la evolución de la enfermedad posterior a la aplicación de la infusión intramamaria del sistema lactoperoxidasa activado en leche negativa a mastitis..

Con el paquete estadístico “INFOSTAB” de Windows, se realizó la Prueba de Wilcoxon (muestras pareadas) a fin de establecer variación de los signos y síntomas del proceso inflamatorio de la ubre; interpretándose así: $P: <0.05$ hay diferencia significativa. $P: >0.05$ no hay diferencia significativa

RESULTADOS

Comportamiento de la mastitis en cabras.

Después de haber realizado la prueba de CMT a 41 cabras en producción, como lo indica la Tabla 2, se encontró que tenían los siguientes grados de infección: a 3+ el 40.24%, a 2 + el 32.93, y a 1 + 12.2% y con posible infección (trazas) 4.8%, mientras que las cabras que aparecieron negativas fueron 9.75%.

Tabla 2. Resultados porcentuales de la prueba California Mastitis Test (CMT) realizado en cabras en producción de leche.

Grado Infección	Mitades ubres	Porcentaje de Infección
3 +	33	40.24
2 +	27	32.93
1 +	10	12.2
Trazas	4	4.88
Negativo	8	9.75
Total	82	100

Fuente: Bracho, 1994.

Los resultados del control de factores de las propiedades físico-químicas de la leche cruda de cabra sin activar el sistema lactoperoxidasa (SLPO) (Tabla 4) fueron: pH 6,8Meq/L, Temperatura 20°C, Densidad 1.032g/L Acidez 17ml Na OH 0.1 N/10, Peroxidasa Cualitativa Positivo, Tocianato 1.023mg/L, Peroxidasa Cuantitativa 2.086µ/L. En la leche activada con el SLPO fueron: pH 6,8Meq/L, Temperatura 20°C, Densidad 1.032g/L, Acidez 17ml Na OH 0.1 N/10, Peroxidasa Cualitativa Positivo, Tocianato 1.048mg/L, Peroxidasa Cuantitativa 2.086µ/L y en la leche activada con el SLPO en el campo fueron: Acidez 17ml Na OH 0.1 N/10, Peroxidasa Cualitativa Positivo.

Tabla 4. Control de factores físicos-químicos de la leche cruda de cabra que guardan relación con el Sistema lactoperoxidasa y su activación.

Parámetros	Leche cruda sin activar SLPO	Leche Con activación SLPO	Leche con SLPO activado en campo.
pH	6,8Meq/L		
Temperatura	20°C	20°C	
Densidad	1.032g/L	1.032g/L	
Acidez	17mlNaOH0.1N/10	17mlNaOH0.1N/10	17mlNaOH0.1N/10

Peroxidasa Cualitativa	Positivo	Positivo	Positivo
Tiocianato	1.023mg/L	1.048mg/L	
Peroxidasa Cuantitativa	2.086μ/L	2.086 μ /L	

Fuente. Bracho, 1994.

Al revisar los resultados del análisis bacteriológico (Tabla 5) se encontró que los géneros de bacterias presentes en la muestra de leche por mitad de ubres derecha, son: *Bacillus* y *Staphylococcus*, ambas con un porcentaje de infección de 40%, *Escherichia* en 20% y *Enterobacter* 0%. En las mitades de ubre izquierda se consiguió la presencia del género *Enterobacter* en un 40%, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Escherichia* en un 20% respectivamente. En la ubre con ambas mitades, los resultados para *Bacillus* y *Staphylococcus* fueron del 30% y para *Escherichia* y *Enterobacter* del 20% respectivamente.

Tabla 5. Resultados del cultivo bacteriológico realizado a un rebaño de cabras en producción de leche positivas a

mastitis subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) en mitades de la ubre.

Género	Derecho	Izquierdo	Promedios
<i>Bacillus spp</i>	40%	20%	30%
<i>Staphylococcus</i>	40%	20%	30%
<i>Enterobacter</i>	0%	40%	20%
<i>Escherichia</i>	20%	20%	20%
Total	100%	100%	100%

Fuente: Bracho, 2004.

En la población de cabras no tratadas con el Sistema lactoperoxidasa (Tabla 6) se encontró que para la fecha del 10/09/08 trece mitades de ubre eran positivas a 2+ y once eran positivas a 3+. Mientras que para la fecha 18/09/08 catorce mitades de ubre eran positivas a 2+ y diez eran positivas a 3+. Cuando se aplicó la prueba de CMT al grupo control de 12 cabras, en fechas consecutivas (Tabla 7) se encontró que 41.7% permanecieron igual a dos cruces, 45.8% igual a tres cruces y el 12.5% subieron el nivel de infección

Tabla 7. Porcentaje de cabras no tratadas con Sistema lactoperoxidasa (SLPO). Resultados de la Prueba California Mastitis Test (CMT).

Grado de Infección	Mitades ubres	Porcentaje de	Grado de Infección	Mitades ubres	Porcentaje de
---------------------------	----------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------------

		Infección		Infección	
2 +	13	54.2	3 +	14	58.3
3 +	11	45.8	2 +	10	41.7
Total	24	100	Total	24	100

Fuente: Bracho, 2004.

En los resultados de la prueba California Mastitis Test después de aplicar infusión intramamaria con el Sistema lactoperoxidasa (SLPO) (Tabla 8), se observa que el tratamiento uno correspondiente a 30 ppm de tiocianato de potasio (SCN^-), donde se trataron a 22 mitades de ubre, los resultados fue el siguiente 2 bajaron a 0, es decir mejoraron totalmente, 1 bajó a trazas, 1 disminuyó a una cruz, 8 bajaron a dos cruces, 5 siguieron igual a tres cruces y 5 se secaron. El tratamiento dos correspondiente a 15 ppm de tiocianato de potasio (SCN^-), y donde fueron tratadas 14 mitades de ubre, el 12 permanecieron igual y 2 aumentaron a tres (3) cruces.

El tratamiento uno correspondiente a 30 ppm de tiocianato de potasio (SCN^-) (Tabla 9), de 22 ubres, fue como sigue 9.09% bajaron a 0 es decir mejoraron totalmente, 4.55% bajaron a trazas y 4.45% a una cruz, 36.36% bajaron a dos cruces, 22.73% siguieron igual a tres cruces y 22.73% se secaron.

Tabla 9. Resultados después de la terapia de control con 30 ppm de Tiocinato de Potasio (SCN⁻)

	Mitades ubres	% Mitades ubres
Bajaron a 0	2	9.09
Bajaron a trazas	1	4.55
Bajaron a 1 +	1	4.55
Bajaron a 2 +	8	36.36
Permanecieron a 3 +	5	22.73
Se secaron	5	22.73
Total	22	100,00

Fuente: Bracho, 2004.

El tratamiento dos correspondiente a 15 ppm de tiocianato de potasio (SCN⁻) (Tabla 10), de 14 mitades de ubre, 85,71 % permanecieron igual y 14,29 % aumentaron a tres (3) cruces.

Tabla 10: Resultados después de la terapia de control con 15 ppm de Tiocinato de Potasio (SCN⁻).

	Mitades ubres	% Mitades ubres
Permanecieron igual	12	85,71

Fuente: Bracho, 2004.

Con la prueba de Wilcoxon (muestras pareadas), los resultados fueron los siguientes (Tabla 11) en las mitades de ubre tratadas con 30 ppm tiocianato de potasio se observaron diferencias significativas, $P: 0.04 < 0.05$ entre los individuos con grado de infección 4. En el tratamiento de 15 ppm de tiocianato de potasio hubo diferencia significativa de $< 0,0001 < 0.05$

Tabla 11: Resultados de la Prueba de Wilcoxon (muestras pareadas) para la aplicación de la terapia con 15 y 30 ppm de Tiocianato de Potasio (SCN⁻) en cabras positivas a dos y tres cruces de mastitis mediante el California Mastitis Test (CMT).

CMT	SC	Mitade	SUMA(R	E(R+	VAR(R	Btp(2cola
	N	s	+)))	+))	s)
3 cruce s	30 pp m	22	178.00	126,5 0	900,63	0,0400
2 cruce s	15 pp m	14	0.00	52.50	217.88	<0,0001

Fuente: Bracho, 2004.

DISCUSIÓN

Control de mastitis subclínica en cabras

De las cabras que participaron de este estudio, el 73.17% resultaron con mitades de ubre positivas a dos y tres cruces en la prueba CMT, coincidiendo con lo reportado por Zambrano y Sánchez, (1998), quienes encontraron una infección de dos rebaños de cabras en producción de leche, uno con 66.6% y 50.42% de mastitis subclínica detectada a través de la misma prueba.

Se determinó la presencia de los géneros de bacterias *Bacillus* (30%), *Staphylococcus* (30%) *Escherichia* (20%). y *Enterobacter* (20%). Estos resultados fueron comparados con las bacterias encontradas por Clavijo *et al.* (2002), en un estudio realizado en dos fincas caprinas del estado Falcón, donde reportaron la presencia de dos especies *Staphylococcus* (62% y 10 %), *Escherichia* (10,3%), *Enterobacter* (6,8%) además de dos especies de *Streptococcus* (10,3% y 6.8%), y *Mycoplasma sp.* (3,4%).

A pesar que en el trabajo de Clavijo *et al.*, 2002, no establece exactamente el municipio donde se realizó el trabajo, según los datos de clima corresponde a una región mucho más húmeda (1528 mm de precipitación/año), contra 957 mm del municipio Colina, de donde se puede inferir que esta diferencia climática condicione la presencia de microorganismos en el

ambiente que puedan infectar las ubres de las cabras en producción.

Se estableció que el tratamiento con 30 ppm de Tiocianato de Potasio aportó mejores resultados en la reducción de niveles de infección de las mitades de la ubre de las cabras con mastitis, lográndose una disminución del proceso inflamatorio en las cabras tratadas en un 54.55%; a pesar de ser esta terapia química una prueba piloto en control de mastitis subclínica en cabras.

Al realizar la prueba aplicando el estadístico de Wilcoxon (muestras pareadas), en las mitades de ubre tratadas con 30 ppm tiocianato de potasio, se observaron diferencias significativas $P = 0.04 < 0.05$ entre las cabras con diagnóstico de mastitis subclínica grado de infección 4. Con el tratamiento de 15 ppm de tiocianato de potasio hubo diferencia significativa de $< 0,0001 < 0.05$ entre las cabras y algunas agravaron su condición al pasar de grado 3 a grado 4.

La terapia con antibióticos se basa principalmente en el uso de antibióticos β – lactámicos como la penicilina y las cefalosporinas, tal como lo señaló Castro *et al.*, (2006), En este trabajo de investigación se pone en evidencia una alternativa importante utilizando el sistema lactoperoxidasa activado para el control mastitis sub-clínica, disminuyendo el uso de antibióticos y la oportunidad de disminuir las trazas de los

antibióticos en la leche, que constituye un problema de salud pública al ocasionar problemas de resistencia a la antibióticoterapia en humanos.

Control de mastitis subclínica en vacas

Se formuló la infusión intramamaria activando el sistema lactoperoxidasa en leche bovina negativa a mastitis, se aplicó tratamiento intramamario en los cuartos de la ubre con dos y tres cruces positivo a California Mastitis Test y, positivos en el cultivo bacteriológico, a fin de evaluar su comportamiento y la evolución de la enfermedad.

Las características del proceso inflamatorio de la ubre y de los agentes causales diagnosticados antes de la aplicación del tratamiento intramamario con el sistema lactoperoxidasa activado registraron variaciones al disminuir el proceso inflamatorio, los microorganismos causantes de la mastitis que se diagnosticaron en el cultivo bacteriológico disminuyeron, luego de aplicar tratamiento con infusión intramamaria del sistema LPO activado, a partir de los niveles naturales de lactoperoxidasa en leche cruda negativa a mastitis con la adición de peróxido de hidrógeno y tóxicano de potasio.

Se demostró la efectividad del tratamiento en un 86,6% de los animales afectados diagnosticados positivos a dos y tres cruces del CMT y al cultivo bacteriológico.

Se reportaron valores de concentraciones de lactoperoxidasa en leche de vacas y cabras, que indican la cantidad de enzima presente en estas leches recién extraídas y como se modifican por efecto del pH, acidez, temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración, a partir de la cual se activa el sistema LPO, que se usa en los tratamientos de control de mastitis en vacas.

CONCLUSIONES

En el diagnóstico del proceso inflamatorio de la ubre mediante el método indirecto California Mastitis Test (CMT), realizado a cuarenta y un (41) animales resultaron positivos a dos y tres cruces sesenta mitades de ubre (73. 17%), a una cruz diez mitades (12.2%), trazas cuatro mitades (4.88%) y negativo ocho mitades (9.75%).

Los microorganismos encontrados en el análisis bacteriológico previo al tratamiento del Sistema Lactoperoxidasa activado fueron los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Escherichia*.

Luego de la aplicación de la infusión intramamaria con el SLPO activado, en dieciocho (18) cabras, se realizó la prueba de CMT, observándose que el tratamiento que resultó efectivo fue el de 30 ppm de Tiocianato de Potasio, ya que hubo una disminución del proceso inflamatorio de la ubre en el 54. 55% de las mitades de ubre; 15 ppm de tiocianato de potasio no hubo mejora en los individuos tratados.

Al realizar la prueba estadística Wilcoxon (muestras pareadas) en las mitades de ubre tratadas con 30 ppm tiocianato de potasio se observaron diferencias significativas, p:

0.04<0.05 entre En el tratamiento de 15 ppm de tiocianato de potasio hubo diferencia significativa de <0,0001< 0.05

El Sistema lactoperoxidasa es efectivo en el control de mastitis subclínica en cabras en concentraciones adecuadas.

RECOMENDACIONES

1. Realizar los ensayos con mayor número de repeticiones, otras concentraciones de Tiocianato de potasio, para establecer el efecto sobre esta enfermedad en los animales tratados.
2. Realizar análisis bacteriológicos post tratamiento para identificar con exactitud los géneros de microorganismos, sobre los que el SLPO ejercen la acción bactericida y/o bacteriostática.
3. Seleccionar rebaños de cabras con manejos semi-intensivo e intensivo en período de secado, para establecer diferencias en cuanto a los resultados, después de aplicada la terapia de control con el SLPO activado.
4. Implementar programas de educación sanitaria y de control de mastitis, en donde se involucre al ganadero y a los ordeñadores, que incluya, limpieza de los corrales, mejora de la rutina de ordeño, higiene de pezones, eliminación de animales crónicos, modificación del orden de ordeño, y tratamiento de secado.
5. Realizar estudios más exhaustivos para determinar el contaje de células somáticas presentes en la leche de cabras y con el aporte de estos estudios ayudar a

clarificar las diferentes opiniones que tienen los investigadores en el contaje real de estas células en la leche de cabras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADEGOKE, G.O. y OYO, M.O. 1982. Biochemical Characterization of Staphylococcus isolated from goats. *Vet. Microbiol*, 7: 463-470 pp.
- AIMUTI, W Y EIGEL, W. 1982. Identification of Casein as Plasmin Derived fragments of Bovine Alfa S1 Casein. *Journal Dairy Science*. 65:175-181.
- ALAIS C. y BLANC, B. 1985. Milk Proteins: Biochemical and Biological Aspects. *Wild Rev. Nutr. Diet.*, 20 (1): 66-71.
- ALAIS, C. 1991. Ciencia de la leche: Principios de Técnicas Lecheras. Compañía Editorial Continental, S.A. México 594 p.
- ALFA LAVAL FOOD. 1990. Manual de Industrias Lácteas. 3da ed. AMV ediciones. Mundi Prensa. Madrid, España 333 p.
- APARICIO, M; PERALTA, L; GARCIA, m. 1986. Potencialización of the Lactoperoxidase System for Preservation of Raw Milk in tropics. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. XXXVI (4). Caracas- Venezuela.
- ARIAS, F. 2008. Modelo de un Sistema Nacional de Generación y Transferencia de Tecnología Agrícola. Taller MPPAT-CEU-FAO. La Seguridad Alimentaría Mundial: Los Desafío del Cambio Climático y la Bioingeniería. FAO en Venezuela. 1-32 p.
- BENNET, A 1999. El sistema lactoperoxidasa (S-LP) de conservación de leche Online. Internet 02-04-2001. Disponible /FAO/ org/ ag/AGA/AGAP/LPS/diary/econf/proceding/pag 2 – sp.Htm.

BEUMER, R; NOOMEN, A; MARIJS, J; KAMPELMACHER, E. 1985. Antibacterial action of the Lactoperoxidase System on *Campylobacter* Jejune in cow's milk. *Nethilk Dairy Journal*: 39, 107-14.

BJORCK, L and GLAESSON, O 1978. Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for lactoperoxidase system in milk. *Journal Dairy Science*: 62 1211-1215.

BJORCK, L. and GLAESSON, O. 1980. Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 63: 919-992.

BJORCK, L 1991. Indigenous Enzymes in milk. V. Lactoperoxidase Food Enzymology. Vol. 1. Edited by fox 100-106; ref 53. Elsevier Applied Science London.

BOSCAN, L. 1973. Aspectos sanitarios de la leche de alta calidad. Seminario sobre la producción de la leche en Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. LUZ. Maracaibo – Venezuela p. 1-11.

BOURGEOIS, R., HERRERA, D. 1999. Enfoque Participativo para el Desarrollo de la Competitividad de los Sistema Agroalimentario. Ediciones IICA. San José de Costa Rica. Pp. 226

BLOOD, H. 1988. Medicina Veterinaria 6ta edición nueva editorial interamericana México D.F. 1411

BLOSSER, T. 1979. Economy losses from and the National Research Program of mastitis in the United States. *J. Dairy Sci.* 62; 119-127

BRACHO, H. 1992. Evaluación de la composición de la leche producida en los Municipios: Federación y Unión del Estado

Falcón en base a la normativa legal vigente. Seminario de postgrado. Universidad Central de Venezuela. 62 p.

BRACHO, H. 1994. Determinación cuantitativa de la actividad de la lactoperoxidasa en leche bovina. Para optar al grado de Magíster Scientiarum en Ciencias. Mención Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Central de Venezuela. p72.

BRACHO, H. 1997. Evaluación del efecto de aditivos antimicrobianos: formaldehído y peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la lactoperoxidasa bovina. Primera conferencia panamericana sobre calidad de los alimentos y nutrición. ILSI de México, A.C.

BRACHO, H. 1999. Legislación sanitaria para el registro y control de alimentos en Venezuela. Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda” para Ascender a la Categoría de Profesor Asociado. Santa Ana de Coro, Falcón-Venezuela p.p. 69.

BRACHO, H. 2004. Actividad enzimática de la lactoperoxidasa (LPO) en leches bovinas y caprinas y activación del sistema LPO, como un mecanismo para conservar leche en ausencia de refrigeración. Trabajo presentado ante la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda para ascender a la categoría de Profesor Titular. Coro – Venezuela. p 110

BREWER CARIÀS, 1985. Instituciones Políticas y Constitucionales. 2da Edición aumentada. Edición Conjunta. Universidad Católica del Táchira y Editorial Jurídica Venezolana. Caracas-San Cristóbal-Venezuela. Pp. 341

BROWN, R.W.; MORSE, G.E. Newbold, F.H.S. y SANTEZ, L.W. 1969. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis. National Mastitis Council Inc. Washington, D.C.

BRUNNER, J. 1970. Milk proteins in food proteins of Whitaker and tannenbow. The AVI publishing Co. Inc. West Port. Conn 201-203 p.

BRUNNER, J. R. 1981. Cow milk proteins Twenty-five years of progress. J. Dairy Sci. 63: 1038-1074.

CALVO, M; SANCHEZ, L; DOLORES, M. 2000. Proteínas de la leche con funciones defensivas. On line internet. 02.03.2001. Disponible [http:// Milksci unizar.es/divulg.html](http://Milksci.unizar.es/divulg.html).

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA. 1990. Proyecto Stabilak San José de las Lajas. Provincia de la Habana. Cuba.

CHECHETKIN, A. 1984. Prácticas de bioquímica del ganado y aves de corral. Edit. Mir. Moscú, 3: 324-325.

C.I.E.P.E. 1992. Factores que determinan la calidad microbiológica de la leche. Unidad Agropecuaria de Industria Láctea Venezolana, C.A. Yaracuy-Venezuela. Pp. 76.

COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS. 1988. Draft Guidelines for the preservation is virtually impossible. Doc. Cx/HF. 88/12.

COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS. 1999. Normas y códigos sobre leche y productos lácteos. Uso del Sistema Lactoperoxidasa donde es imposible la refrigeración. Doc. Cx/HF. 99/12.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 658-86. Determinación de acidez titulable.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No.798-89. Requisitos microbiológicos, leche pasteurizada.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 938-83. Técnicas o procedimientos de tomas de muestras de leche y productos lácteos.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 902-82. Recuento de Microorganismos Mesófilos Aerobios.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 903-93. 2da Revisión Requisitos Microbiológicos, Leche cruda.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 1104-84. Determinación del número más probable (NMP). De Coliformes fecales y totales. Determinación de *Escherichia coli*.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 1126-89. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma No. 1292-89. Determinación *Staphylococcus aureus*.

CONNEL and HEADON. 1993. Lactoferrin, lactoperoxidasa and Lysozyme; nature's Protective Proteins. Biotechnology and the feed industry. T.p. Lyons; 4:123-132.

CONTRERAS, L. 1992. Enfermedades de los bovinos. 1era Edición. Barquisimeto estado Lara. Venezuela pp.1004.

CORBIN, E. and WHITTIER, E. 1965. The composition of milk in fundamentals of Dairy chemistry. The AVI publishing Co-West Port. Conn 25-269 p.

DILANJAN, S. 1976. Fundamentos de la Elaboración del Queso. Editorial Acibia, de la Edición en Lengua Española. Zaragoza España. p.p 121

DOBBINS, CH. N. 1977. Mastitis Losses Y. AM. VET. MED. ASSIC. 170 (10) Part. 2. 1129-1132.

EAST, N. E. y BIRNIE, E. F. 1983. Diseases of the Udder. Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice No. 3.5: 591-599

FAO.OMS. 1991. Boletín Técnico No. 789. Documento CxS-70. Vigésimo Segundo Período de Sesiones 69-72. 35 va. Reunión OMS.

GACETA OFICIAL DE VENEZUELA. 1959. Ley Sobre Normas Técnicas y Control de Calidad. Número 2529 Extraordinaria.

GAYA, P; MEDINA, M; NÚÑEZ; M. 1997. Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperature. Applied and Environmental Microbiology, 57 (11): 3355-3360.

GEGRE-EGZIABHER, .A. WOOD, H.C.; ROBAR, J. D. y BLANKENAGET, G. 1979. Evaluation of Automatic Mastitis Detection Equipment. J. Dairy. Sci. 62: 1108-1114.

GOURSAUD, J. 1991. Composición y Propiedades físico-químicas de la leche de vaca. Leche y Productos Lácteos vaca, oveja, cabra. Tomo 1. La leche de la mama a la lechería. Editorial Acibia S.A. 1:3-92.

HADDADIN, M; IBRAHIM, S; ROBINSON, R. 1997. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidasa system. Food Control: 7 (3) 149-152.

HAENLEIN, G. F. 1987. Cowhand Goat Milk Are not the same especially in Somatic cell cont. J. Dairy Goats. 65 (12): 31.

HARRIS, B. 1993. Looks Mastitis control. Research. J. Dairy goats 64-48.

HEESCHEN, W. 1995. Influence of Udder Disease (Mastitis) on quality and hygienic properties of milk Milchpraxis 33: 3, 108-113.

INTERNATIONAL COMISION O MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (I.C.M.S.F). 1983. Microbiología de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos. Vol. I. 2da. Ed. Acribia Zaragoza, España. 365 pp.

I.D.F. 1988. Código de práctica para preservación de leche fresca a través del Sistema Lactoperoxidasa. Boletín del Diario Internacional de la Federación. No. 234: 3-5.

JIMÉNEZ, L.; MÁRQUEZ, N.; MORCUENDE, R. 2016. El papel que debe desempeñar el Médico Veterinario en el tratamiento de las mastitis es fundamental, implantando buenas prácticas de manejo y control. Informativo Veterinario Albéitar P.V. Servet Digital. España.

KAMAU, D.; DOORES, S. and PRUITT, K. 1990. Antibacterial activity of the Lactoperoxidase System against Listeria monocitogenes and Staphylococcus aureus in milk. Journal Food protection; 53: 1010A-1014. U.S.A.

KAMAU, D, N.; DORES, S & PRUIT, K. M. 1991. Antibacterial activity of the lactoperoxidasa system against Listeria

monocitogenes and Staphylococcus aureus in milk. Journal food protection 53: 10104.

KIRK, J. H. 1981. Programmable calculator program for assessment of losses due to subclinical mastitis. Vet. Med. Small clinician. 76 (4): 561.

KOBAYASHET, Y. 1978. Simplifies Reassuring. Rennet test for Diagnosis of mastitis J. Dairy Sci. 61: 592-595.

KONERMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R.; SAMMER, H. M. 1979. Color Atta and textbook of diagnostic microbiology. Pippincot, Philadelphia.

KUNKEL, J. R. BUSHNELL, R. B; CULLOR, J. y ALOENG, J. 1987. Studies on induced Klebsiella mastitis with relationships common N – acetyl B. D. glucosaminidase, bacterial and somatic del count. Cornell Vet. 77: 225-234.

KORHONEN, H. 1980. A new method for preserving raw milk: The Lactoperoxidase antibacterial System. World animals. Rev; 35: 23-29.

KUTMER, M. H. 1974. Hypothesis testing in linear models. The American Statiscian No. 28. P 98-100.

LENHINGER, A. L. 1991. Principios de bioquímica. 2da. Ed. Ediciones Omega S.A. Barcelona – España. P. 120-218.

LEROBDELLE, C. Y. POUTREL B. 1994. Characteristics of nonclinical Mammary infections of goats. Ann Rech, Vet. 15 (1), 113-11.

LINDEN, G; HUMERT, G. DESNOUVEAX, R. and PICKA, R. 1982. Aplicaciones de la dilución completa de la leche para la determinación de algunas actividades enzimáticas. Le Laít 62, pp. 209-219.

LUCK, H. 1966. El empleo del agua oxigenada en leche y productos lácteos en higiene de la leche. ABDUSSLAM-F.A.O.-O.M.S. Ginebra. p. 461-485.

MACFADDIN, J. F. 1976. Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams, Baltimore.

MAC-FONAIAP. 1980. Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. 2da. Ed. Caracas-Venezuela. 380. pp.

MAGDALENO, A., BRACHO, H. 2001. Estudio del mecanismo protector de la ubre frente a la mastitis, por activación del sistema lactoperoxidasa en infusión intramamaria. Trabajo Especial de Grado para Médico Veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro – Venezuela 63 p.

MAHIEU, H. 1991. Factores que influyen en la composición de la leche. Leche y productos lácteos, vaca, oveja, cabra. Tomo I. Acribia, S.A. p. 117-179.

MAISI, P. RIIPINEN, I. 1988. Use of California mastitis test, N-acetyl – b glucosaminidase, and antitrypsin to diagnose caprine subclinical mastitis. Journal of Dairy Research. 55: 309-314.

MARTIN, F., LARIVIERE, S., GUTIERREZ, A. Y REYES, A. 1999. Pautas para el Análisis de los Circuitos Agroalimentarios. Ediciones Fundación Polar. Caracas. 237 p

MARTINEZ, C.E; MENDOZA, P. G; ALARCON, F. J; GARCIA, H. 1988. Reactivation of the Lactoperoxidase System during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk. Journal of food protection 51: 7. 558-561.

MARTINEZ, G. A. 1988. Diseños Experimentales, Métodos y Elementos de Teoría Editorial Trilla, S.A. de C.U México.

MELLENGERGER, R. 1979. Somatucell counts in goat's Milk. 18 th annual meeting of the national mastitis council, Inc., Louisville, Ky. 41-43 pp.

MIJACEVIC, Z; OTENHAJMER, I; IVANOVIC, D. 1989. The antimicrobial effect of the lactoperoxidasa-Thiocianate-Hydrogen Peroxide System in milk, 39(13). Pág. 199-204.16 ref.

MILLER, R. 1985. Multiple comparisons. Encyclopedia of Statistic Science. John Wiley and Sons. New York. P 679-689.

MULLAN, W.; WASTERHOUSE, A.; DAVIES, G. and WADE, V. 1980. The production and Storage stability of lactoperoxidasa. Bull Dairy Industries International. 41 (12); 14-18.

PEREZ, M. 1994. Epidemiología de la Brucelosis Bovina. Curso de Actualización en Brucelosis. División de Postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia y Ministerio de Agricultura y Cría. p.p 1

PERRAUDIN, J. P 1991. Lactoperoxidase a natural preservative. J. Dairy Industries International; 56 (12): 21-24.

PONCE, P.; LÓPEZ, M. and MARTINEZ, E. 1994. Preservation of milk Without refrigeration through the activation of the lactoperoxidasa System. Revista de salud animal. 9:2 pág. 120-128.

PORTMAN, A; y AUCLAIR, J. 1999. Relation Between lactenine L2 et. La lactoperoxidasa. Le Lait. 39.147-158.

POUTERL y REINARD. 1981. California mastitis test guide of selective Dry Cow Therapy J. Dairy. Sci. 64 (2): 241-248.

POUTERL, B. 1984. Udder infection of goat's by coagulase – Negative Staphylococci. *Veterinary Microbiology*. 131-137.

PUTTER, J. 1974. Peroxidase in *Methods of analysis enzymatic*. Vol. Two, Second Edition. Edited by Hans Ulrich Bergmeyer. Academic Press. Inc.

PRINSLOO, N. SELLER, J. 1999. Producción lechera en las Highland de Sudáfrica. Online, Internet 02/04/2001. Disponible/fao/ org/ aga/agap/lps/ dairy/econf/proceding/pp 2 – sp. Htm.

REITER, B. 1978. Review of the progress of Dairy Science. *Antimicrobial System in milk journal of dairy research*. *Scie*. 45: 131-147.

REITER, B. 1985. The lactoperoxidasa system of bovine in the lactoperoxidasa. System Ed. K. M. Pruitt and Tenovuo, J. O. Marcel Dekker, New York; 60: 123-141.

RIVERO, K; SANGRONIS, K.; BRACHO, H. 1999. Evaluación de las pruebas de california mastitis test y Detector Electrónico Draminski en vacas a nivel de fincas. Trabajo especial de Grado para Médico Veterinario. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Cs. Veterinarias. Coro, Venezuela. pp 65.

ROBINSON, R. 1987. *Microbiología Lactológica*. Acribia, S.A. vol. II . Zaragoza. España p. 39, 43, 116, 124, 133.

RODRÍGUEZ, B. N.; MARTÍN. E. 1980. *Análisis de alimentos Tomo I. Organización de Bienestar estudiantil (O.B.E)* Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela. 276 pp.

SAHA. S.K. and SINGHAL, K.K. 1993. Thiocyanate excretion in milk of different species of ruminates feed on mustar cake supplemented ration. *Indian J. Dairy Sci*; 4 (2): 43- 46.

SCARAMELLI, A. 1988. Comparación de tres métodos indirectos para la detección de mastitis subclínica bovina B.vitria (1)- 64-65.

SIEVERS, G. 1980. Structure of Milk Lactoperoxidase. A study using circular dichroism difference absorption spectroscopy. Biochym. Biophys Acta, 624-249-259.

SMITH, M. C. y ROQUINKY, M. 1977. Mastitis and other Diseases the goat's udder. Journal, of the American Veterinary Medical Association 171 (12): 1241-1248.

STHELING R. N.; VARGAS, O. L.; SANTOS, E. C. DOS, DUARTE, R. M. 1986. Estudio da evolucao de mamite caprina inducida por enterotoxina estafilocócica e estreptocócica. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 36 (5): 701-717.

STEFANO, G.; PIACQUADIO, P.; SCIANCALEPORE, V. 1997. Effect of Lactoperoxidase System activation on acid production in raw milk at refrigeration temperature .Latte; 20 (10): 1128-1131.

TARABLA, H. CALVINHO, L. CANAOSIO, V. 1999. Eficacia de una combinación de Espiramicina y sulfato de neomicina como tratamiento intramamario de vaca seca. Online Internet. 02/04/2001/disponible <http://www-campo.com/lechtamboSanidad29.htm>.

TIZARD, J. 1992. Inmunología Veterinaria. Destrucción del material extraño. El Sistema Micolide. 2da. Ed. P 23-26.

VALLE, J; GOMEZ, E.; PIRIZ, S; GOYACHE, J; ORDEN, J.A and VADILLO, S. 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goat's

VARGAS, T. Y LOPEZ, N. 1979. Normas para el examen de productos lácteos. Método oficial AOAC. VI edición 1945. Organización panamericana de la salud. No. 84, 1973.

VIHAN, V. Y SAHANI, K. L. 1987. Observation of efficacy of various of indirect diagnostic test for detection of subclinical mastitis in goats Ind. Vet. J. 64: 715-716.

WHITAKER, J. 1972. Principals of enzymology for the food science Marcel Ducker Inc. U.S.A.

WHITE, C. H. and MARSHALL. 1973. Reductions of shelf life of from *Pseudomonas fluorescens*. Journal Dairy Sci.; 56: 849-853.

ZAJAC, M; GLADYS, S.; SHARZYN. SKA, M.; HARNALY, G. and BJORCK, L. 1993. Change in bacteriological quality of raw milk stabilized by activation of its Lactoperoxidase System and Stored at different temperature. Journal Food protection; 46: 1065-1068.

ZEMELMAN, R. LOGERIL. BERGENET, I. 1996. Estudio bacteriológico de la mastitis bovina en algunos rebaños chilenos. Rev. LaTAME. Microbiol. Parasitol. 8: 133-138.

IV

CONTROL DE LA DIARREA COLIBACILAR EN LECHONES USANDO EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA ACTIVADO EN LECHE DE VACA

INTRODUCCION

La diarrea de origen bacteriano es causada por *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonellas* y algunas son originadas por protozoarios como *Coccidia* y *Cristoporidium*. Además de aquellas de origen viral. Cada uno de estos agentes presenta una manifestación clínica diferente pero todo conlleva al cuadro degenerativo en donde se alteran las funciones fisiológicas normales del animal, trayendo como consecuencia pérdidas económicas fundamentales. Pineda (1987), observó que la diarrea en cerdos durante las primeras semanas de vida, es un proceso complejo donde interactúan varios factores, *Escherichia coli* enteropatógena ha sido incriminada como una de las causas determinantes de este proceso; cursando con alta morbilidad y mortalidad en las granjas porcinas del país.

Mantecón y Ahumada (2002), señalaron que el aparato digestivo del lechón en el momento de nacer es bacteriológicamente estéril, en las 24-48 horas posteriores al nacimiento es colonizado por un número elevado de gérmenes provenientes del ambiente que lo rodea, y de su propia madre. Su equilibrio microbiano (patógenos y saprofitos) está estrechamente relacionado con el estado de salud de los lechones.

Merck (2002), establece que la diarrea en cerdos es una enfermedad que se caracteriza por un incremento de la motilidad intestinal del individuo que consecuentemente produce deshidratación, acidosis metabólica y muerte en algunos casos. La colibacilosis entérica se presenta en lechones lactantes y al destete, es causada por la colonización del intestino delgado de la cepa patógena *Escherichia coli* (*E. coli*), que produce la secreción de líquidos y electrolitos hacia la luz intestinal; para su diagnóstico se puede hacer prueba de inmunofluorescencia y aislamiento del microorganismo a partir de cultivos bacterianos de heces. El porcentaje de mortalidad varía de un lugar a otro, pero siempre presenta pérdidas significativas. Según los reportes de mortalidad de los lechones antes del destete, en diferentes países se ha visto que varía entre 20 y 30%.

Las entidades clínicas más frecuentes son colibacilosis (56,2%), *Adenomatosis* (17,5%), *Salmonelosis* (13,3%) y *Disentería* (13%) (Pineda *et al.*, 1992).

Fairbrother (1992), consideró que la *Escherichia coli* es uno de los principales agentes que produce diarrea neonatal y post-destete en cerdos. Sin embargo la diarrea en lechones puede ser ocasionada por otros agentes como virus y parásitos La

transmisión de *E.coli* en los lechones es por vía oral, por contaminación del alimento o ubres de la cerda, debido a la mala higiene en la sala de partos y se han reportado aislamientos de *E.coli* del conducto uterino y vagina de la cerda, lo que sugiere que pueden nacer infectados antes o durante el parto.

Radostits *et al.* (2002), demostraron que *E. coli* enterotóxica, produce la enfermedad antes del quinto día. La colibacilosis es un desorden intestinal de los lechones recién nacidos caracterizado por diarrea severa. Esta condición es causada por cepas de la bacteria *Escherichia coli* y también es conocida como diarrea del recién nacido (Díaz, 2002).

Holm y Poulsen (1996), determinaron que la *E. coli* también puede perturbar la mucosa intestinal, permitiendo a la bacteria ir desde la mucosa a la sangre y órganos internos causando septicemia. Las dietas que influyen sobre la capacidad de absorción del intestino hacen al mismo más propenso a la colonización y subsiguiente diarrea. Dietas altamente digeribles ad libitum reducen los problemas post destete, así como el suministro de alimentos de arranque, bajar el pH del tracto gastrointestinal es la base para el control estratégico de estos problemas.

La diarrea colibacilar que afecta el crecimiento de los animales, no tiene consecuencias tan graves como la enfermedad de los edemas. Sus causas están originadas en dos tipos de colibacilos: *E. coli enterotoxigénica*, *E. coli enteropatógena*. Las cepas de *E. coli enterotoxigénica* producen enterotoxinas que alteran el equilibrio electrolítico y provocan diarrea secretora. Muy frecuentemente (en más del 50% de los casos) este tipo de cepas son asimismo aisladas en animales afectados con diarreas en el engorde. En cambio, las cepas de *E. coli enteropatógena* provocan lesiones por adhesión y destrucción directamente sobre la célula y originan diarreas osmóticas por mala absorción. Aunque estas enteritis son menos graves que las producidas por las cepas de *E. coli enterotoxigénica*, los animales afectados tardan más tiempo en recuperarse (Sttjar, 2002).

SISTEMA LACTOPEROXIDASA (SLPO)

Bracho, (2004) y Bracho (2013) estudió el sistema lactoperoxidasa activado en leche de vaca, a través de estudios descriptivos y de tipo experimental, verificando el efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa activado en leche bovina y caprina sobre microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales *Escherichi coli* y *staphylococcus* sp. FAO (1991), establece que el método de la lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno es un sistema enzimático antibacteriano natural, presente en la leche y en la saliva humana.

La enzima lactoperoxidasa se halla en la leche de bovino y búfalo en concentraciones relativamente elevadas. Puede oxidar los iones de tiocianato en presencia del peróxido de hidrógeno. Esta reacción permite convertir el tiocianato en ácido hipotiocianoso (HOSCN). Con el pH de la leche, el HOSCN se disocia y se presenta principalmente en forma de iones de hipotiocionato (OSCN⁻). Este reacciona específicamente con los grupos de sulfhidrilos libres, inactivando así varias enzimas vitales para el metabolismo bacteriano y, en consecuencia, obstaculizando éste y la capacidad reproductora de las bacterias.

Como las proteínas de la leche contienen muy pocos grupos de sulfhidrilos y los que se hallan presentes son relativamente inaccesibles al OSCN- (enmascarado), la reacción de este compuesto en la leche es bastante específica y combate las bacterias presentes en la leche.

Según Kamau *et al.*, 1993, las actividades antibacteriales de la leche podrían estar relacionadas con la actividad de la peróxidasa, basada en la observación de la correlación en cuanto a termo resistencia entre la peróxidasa y las propiedades antibacteriales de la misma leche, las cuales se pierden por encima de ciertos tratamientos térmicos.

Los reportes encontrados de la enzima lactoperoxidasa y tiosulfonato en Venezuela indican estadísticamente que la actividad enzimática en la leche de vaca resulta fuertemente afectada por las diferentes lactancias y los periodos de lactación Bracho, (1994); Bracho, (2013), originando la necesidad de conocer las concentraciones nativas en la leche de estos dos sustratos en el proceso de activación del sistema LPO en la leche, Björck (1993).

Kamau *et al.*, (1993) indicaron que el sistema lactoperoxidasa/tiosulfonato/peróxido de hidrogeno (Sistema Lactoperoxidasa) consiste en la oxidación de los iones

tiocionato por la acción de la enzima lactoperoxidasa en presencia del peróxido de hidrogeno y la consecuente acción de dichos iones oxidados sobre las bacterias presentes en la leche, este constituye un mecanismo de defensa natural del organismo y sus componentes aparecen en altas concentraciones en la saliva, jugo gástrico y en la propia glándula mamaria, por lo que se considera que su activación no representa peligro para los individuos que la ingieran Björk y Glaesson, (1980)

El sistema lactoperoxidasa está compuesto por la enzima lactoperoxidasa en concentraciones de 30mg/l de leche, tiocionato 0,02-0,25mg y peróxido de hidrógeno, cuya fuente en la leche puede ser: por vía enzimática mediante el sistema glucosa /glucosa oxidasa, por acción microbiana del lactobacilo en el abomaso y por acción directa; se habla de actividad específica de la enzima cuando esta es expresada por números de unidades de enzimas por miligramo de proteínas (Mullan *et al.*, 1980).

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio experimental y controlado, con una muestra representativa de lechones con diarrea, en una granja porcina de ciclo completo en el Municipio Buchivacoa del Estado Falcón, Venezuela.

Población en estudio y tamaño de la muestra

Para el ensayo experimental se utilizaron 71 cerdos lactantes (*Suis domesticus*) correspondientes a seis (06) camadas de lechones con edades de cuatro (04) y nueve (09) días y pesos comprendidos entre 1200 a 2300 gramos, ubicados una granja de ciclo completo ubicada en Municipio Buchivacóa del estado Falcón, Venezuela, los cuales presentaron síntomas y signos como: heces líquidas (diarrea obligatorio), pérdida de peso y decaimiento.

Fase de campo I

Se realizó toma de muestras de heces por medio de hisopado rectal, previa asepsia; se transportaron en enfriamiento al laboratorio de Microbiología del Programa Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional experimental “Francisco de Miranda” (UNEFM), en Coro-Falcón, Venezuela,

para ser sometidas a análisis con fines de realizar diagnóstico del agente causal.

Fase de laboratorio I

Para el aislamiento de la *E. coli*, se cumplió con un protocolo de pruebas, para llegar al diagnóstico del agente causal de diarreas. Usándose como medios de cultivo: Agar Levine, y Medio de Infusión Cerebro Corazón (agar BHI); Coloración de Gram. Pruebas de Catalasa y Oxidasa. Prueba de Producción de Hemólisis. Además pruebas bioquímicas tales como: Rojo de Metilo, Vogues Proskauer, Citrato, Indol y Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) Pelezar *et al.* , (1982); Prescott *et al.* , (1999).

Fase de Laboratorio II

Se obtuvieron 03 litros de leche de vaca, descartando estrictamente la presencia de mastitis, (historia de mastitis), determinado por la prueba de California Mastitis Test usando reactivo Alquil Aril Sulfonato de sodio Pouterl y Reinard, (1981), de una unidad de producción seleccionada del Municipio Falcón del Estado Falcón, Venezuela, para garantizar que la misma no sufriera cambios físico-químicos que alteran la presencia de la enzima lactoperoxidasa y el tiocianato en la leche. Se trasladó refrigerada al Laboratorio de Tecnología de Alimentos del Centro de Investigaciones Tecnológicas (CITEC)

de la UNEFM; donde en condiciones de refrigeración se realizó la activación del sistema LPO. Se controlaron los factores que hacen variar la concentración de la enzima lactoperoxidasa en su proceso de activación, así como también posterior a éste; mediante la determinación de la acidez titulable a través del Método COVENIN 1997-658 y el control del pH y la Temperatura por métodos instrumentales, usando pH-metro Corning 125, con plott de temperatura incorporado.

Detección de la enzima peroxidasa (método cualitativo)

En esta detección se usó solución de guayacol al 10% en acetona, preparada 2-3 días antes de su empleo. Se colocó con una pipeta 10 ml de la muestra preparada en un tubo de ensayo y se le adicionó 2 o 3 gotas de solución de peróxido de hidrógeno al 3%, luego se le colocó 8 gotas de solución de guayacol al 10% por las paredes.

La formación de una banda color rojizo en la zona de contacto, es el indicativo de la presencia de peroxidasa (ensayo de Arnold) Bracho, (2013).

Determinación cuantitativa de la peroxidasa en leche

Se utilizó el método de Johann Pütter, (1974) citado por Bracho (1994), en el cual se usa un buffer fosfato (0.1 m, pH 7) compuesto de fosfato de potasio monobásico y fosfato de

potasio dibásico, además solución de guayacol (20.1mM) y solución de peróxido de hidrógeno (12.3mM).

Se introduce en una cubeta: 3ml de Buffer fosfato (0.1M); 0.05ml de solución guayacol (0.3mM), 0.10ml de muestra de leche y 0.03ml de solución de peróxido de hidrógeno (0.1mM), se agita y deja reaccionar por dos minutos a 25°C (Linden *et al.*, 1982), y por último se lee la extinción de la solución en el espectrofotómetro a 436 nm de longitud de onda.

Determinación cuantitativa del tiocianato

La determinación cuantitativa de tiocianato de potasio, se utilizó ácido tricloroacético, reactivo sorbo (25g de Nitrato de hierro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) disuelto en 50 ml de ácido nítrico HNO_3 y se lleva a 250ml de agua destilada.

Activación del Sistema Lactoperoxidasa (SLPO)

En la leche cruda mantenida en condiciones de refrigeración, se realizó la activación del sistema LPO. Se controlaron los factores que hacen variar la concentración de la enzima lactoperoxidasa y tiocianato en su proceso de activación, así como también posterior a éste; mediante la determinación de la acidez titulable a través del Método COVENIN 1997-658 y el control del pH y la Temperatura por métodos instrumentales, usando pH-metro Corning 125, con plott de temperatura incorporado.

Para activar el sistema en la leche de vaca se utilizó una concentración de H_2O_2 de 0,06% (Bracho, 1994) además de 30 ppm de tiocianato de potasio por cada 150 ml de leche fresca con una acidez titulable de 16ml NaOH 0, 1 N en 100 ml de muestra y con pH 6,8. Directamente se agregó 3ml de peróxido de hidrogeno y 0,0045g de tiocianato de potasio por cada 150 ml de leche.

Conservación de la leche con el sistema LPO activado

La leche fue vertida en frascos de vidrio de 250 ml previamente esterilizados y posteriormente se refrigeró hasta el momento de su utilización.

Fase de Campo II

Una vez identificados los animales que cumplían con la sintomatología diarreica, que consistió en 60 lechones diagnosticados por el laboratorio, de ser de origen colibacilar, se procedió administrar leche de vaca con el sistema LPO activado, de los cuales el tratamiento (T1) utilizó 25 lechones; (T2) 20 y se le suministró leche cruda sin el sistema (LPO), y (T3) 15 se estableció como control, lechones en estudio comprendían edades entre cuatro (04) y nueve (09) días de nacidos, tomándose en cuenta como variables: tipo de heces

(consistencia), frecuencia de evacuación y consistencia física y vitalidad del animal.

Previamente a la administración del sistema LPO activado se monitoreo su presencia mediante la prueba cualitativa, luego se procedió a la administración del tratamiento (T1) suministrando 1ml/100g del peso vivo, con un dosificador de aplicación oral, una vez al día por 3 días. Al grupo (T2) se le aplico leche de vaca sin la activación del sistema LPO con una dosis de 1 ml/100g del peso vivo y el grupo control (T3) estuvo sometido a la lactación materna. Las observaciones se llevaron a cabo desde las primeras 24 horas post tratamiento hasta las 72 horas, evidenciando los cambios favorables de los lechones tratados con sistema LPO activado en comparación a los que se le suministro leche sin LPO activado, con respecto al grupo control.

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a estadística descriptiva y luego a estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal – Wallis utilizando el programa de Statistic 4.0, donde se detectó que al menos uno de los tratamientos reportó un efecto significativo sobre las variables evaluadas (valores de $P < 0,05$); se realizaron comparaciones entre tratamientos, aplicando la prueba de Wilcoxon (Mann – Whitney U) para

pares de muestras independientes; el nivel de significancia empleado en la prueba fue el alfa corregido de Bonferroni, obtenido dividiendo el nivel de significancia utilizado en la prueba de Kruskal – Wallis entre el número de comparaciones posibles Wayne,1995.

Diariamente se realizó el registró del comportamiento de los grupos de lechones sometidos al ensayo experimental tabulando como variables: estado físico de los lechones, consistencia de las heces y frecuencia de evacuación ver Tabla 1.

Tabla 1. Registro del comportamiento de los grupos de lechones establecido como variables: estado físico de lechones, consistencia de excretas y frecuencia de evacuación.

Variable Estado físico de los lechones:		Tipo
Con mejoría		1
Decaído		2
Variable Consistencias de las heces:		Tipo
Líquida		1
Pastosa		2
Normal		3
Variable Frecuencia de evacuación:		
Normal = 1	Leve = 2	Moderada = 3
Una defecación por cada hora.	Tres defecaciones por cada hora.	Cinco defecaciones por cada hora.

Fuente: Bracho, 2004.

RESULTADOS

Tabla 2. Control de factores: pH, temperatura, acidez en la determinación de peroxidasa cualitativa, cuantitativa y de tiocianato en la leche cruda de vaca utilizada en el ensayo, para la activación del sistema LPO

Parámetros	Leche cruda sin activar el SLPO.	Leche cruda con el SLPO activado en el laboratorio.	Leche cruda con el SLPO activado, manejado en campo
pH	06,68 meq/L	06,61 meq/L	
Temperatura	17 ° C	24 ° C	
Acidez	15 ml NaOH 0,1 N/ 10		15 ml NaOH 0,1 N/ 10
Peroxidasa Cualitativa	Positivo		Positivo
Tiocianato		7,8 ppm	
Peroxidasa cuantitativa		3073 U/L	

Leyenda:

Meq/L: mili equivalente sobre litros de leche.

° C: grados centígrados.

NaOH 0,1 N/10: hidróxido de sodio 0,1 Normal en mililitros de leche.

Ppm: partes por millón.

U/L: unidades por litro.

Fuente: Bracho, 2004.

Tabla 3. Lechones de la Granja de ciclo completo, del municipio Buchivacóa estado Falcón, que formaron parte del ensayo para evaluar el efecto del sistema LPO en el control de la diarrea colibacilar.

Jaula	Fecha de nacimiento	Lechones vivos.	Lechones enfermos	Días de vida en que se aplicó el tratamiento
11	17/4/16	12	10	05
33	15/4/16	11	10	07
19	18/4/16	12	10	04
54	14/4/16	11	10	08
9	18/4/16	13	10	06
16	13/4/16	12	10	09
TOTAL	06	71	60	

Fuente: Bracho. 2004.

De los sesenta (60) lechones con diarrea muestreados por hisopado rectal y sometidos a análisis microbiológico para diagnosticar el agente causal, resultaron positivos a *Escherichia coli* todos los lechones en las pruebas con agar Levine, al frotis para la tinción de Gram, así como también, para las reacciones de oxidasa y catalasa y las pruebas bioquímicas complementarias: Rojo de Metilo, Vogues Proskauer, Indol, Citrato, agar Triple Azúcar Hierro (TSI) y Hemólisis. El 100% de los lechones padecían de diarrea de origen colibacilar.

A veinticinco (25) lechones con diarrea colibacilar se le aplicó una dosis (T1) de 1ml de leche de vaca activada con el sistema LPO por cada 100gr. de peso vivo y a las 24 horas de aplicado el tratamiento, se observó mejoría en cuanto a vitalidad y conformación en veintitrés (23) de los veinticinco (25) lechones tratados, mientras que decaídos se mantenían dos (02) lechones. A las 48 horas se pudo observar que veinticuatro (24) lechones presentaban mejoría y solo un (01) lechón mantenía condiciones de decaimiento. A las 72 horas, se observa que se mantuvieron igual que el día anterior (ver tabla 4).

Tabla 4. Estados físicos de los lechones con diarrea colibacilar en cuanto a vitalidad y conformación (V y C) tratados con leche cruda de vaca con el sistema SLPO activado.

Estado físico (V y C)	24 horas (T1).	48 horas (T1).	72 horas (T1).
Con mejoría	23 (92%)	24 (96%)	24 (96%)
Decaído	02 (08%)	01 (04%)	01 (04%)
TOTAL	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 5, se presentaron los resultados en cuanto a la consistencia de las heces. Para las 24 horas post tratamiento el 72% de las heces de los lechones presentaban una consistencia pastosa y un 20% era normal y solamente el 8% eran líquidas; a las 48 horas siguientes había un 40% de las heces pastosa, 60% sólidas y 0% líquidas. A las 72 horas se presentaron un 32% de los lechones con heces pastosas, un 60% con excretas normales y el 8% restante mantenía heces líquidas.

Tabla 5. Consistencias de las heces de lechones, tratados con leche cruda de vaca con el sistema SLPO activado.

Consistencia de las heces.	Número de lechones 24 horas (T1).	Número de lechones 48 horas (T2).	Número de lechones 72 horas (T3).
Líquidas	02 (08%)	0	02 (08%)
Pastosas	18 (72%)	10 (40%)	08 (32%)
Normal	05 (20%)	15 (60%)	15 (60%)
TOTAL	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 6, se presenta la frecuencia de las evacuaciones de los lechones, a las 24 horas de tratamiento el 72% de los lechones presentaban evacuaciones de tipo leve de fácil visualización, el 20% normal y el 08% moderadas, ya para las 48 horas la frecuencia de evacuaciones leves se ubicó en un 60%, 36% evacuaciones normales y un 4% evacuaciones moderadas; al lapso de 72 horas el 44% de los lechones manifestaron evacuaciones leves mientras que el 66% restante mantenía evacuaciones normales y solo el 4% con frecuencia moderada.

Tabla 6. Frecuencia de evacuaciones (F E) de los lechones, tratados con leche cruda de vaca con el sistema LPO activado.

F E	24 horas (T1).	48 horas (T1).	72 horas (T1).
Moderadas	02 (08%)	01 (04%)	01 (04%)
Leves	18 (72%)	15 (60%)	10 (40%)
Normal	05 (20%)	09 (36%)	14 (56%)
TOTAL	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)

Fuente: Bracho, 2004

En la tabla 7, se evidencia el desmejoramiento de los animales al no recibir tratamiento: a las 24 horas se encontraba el 70% de los animales con una condición física decaído, ya que su contextura mostraba un marcado desmejoramiento, el 30% restante estaba en una buena mejoría. A las 48 horas siguientes la proporción de lechones en desmejoramiento aumento hasta un 80% y el 20% restante mantenía un buen estado de conformación y vitalidad, y a las 72 horas el 100% de los lechones estaban completamente decaídos.

Tabla 7. Estado físico en cuanto a vitalidad y conformación (V y C) de los lechones con diarrea colibacilar, tratados con leche cruda de vaca sin activación del SLPO.

V y C	24 horas (T2).	48horas (T2).	72 horas (T2).
Con mejoría	06 (30%)	04 (20%)	0
Decaído	14 (70%)	16 (80%)	20 (100%)
TOTAL	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 8, la consistencia de las heces manifiestan un comportamiento a las 24 horas de un 90% de lechones con una diarrea líquida y el 10% con heces pastosas, y para las 48 horas siguiente aumento a un 100% de excretas líquidas, y a las 72 horas la consistencia de las heces en todos los lechones se mantuvo completamente líquido.

Tabla 8. Consistencias de las heces (C H) de los lechones con diarrea colibacilar, tratados con leche cruda de vaca sin activación del SLPO.

C H	24 horas (T2).	48 horas (T2).	72 horas (T2).
Líquidas	18 (90%)	20 (100%)	20 (100%)
Pastosas	02 (10%)	0	0
Normal	0	0	0

TOTAL 20 (100%) 20 (100%) 20 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 9 se refleja el comportamiento de los lechones que estuvieron solamente con el suministro de leche sin el sistema LPO activado, como se puede observar en las 72 horas de realización del ensayo todos los lechones presentaron una frecuencia del 90% de evacuaciones moderadas y un 10% leves.

Tabla 9. Frecuencia de evacuaciones (F E) de los lechones con diarrea colibacilar, tratados con leche cruda de vaca sin activación del SLPO.

F E	24 horas (T2).	48 horas (T2).	72 horas (T2).
Moderadas	18 (90%)	18 (90%)	18 (90%)
Leves	02 (10%)	02 (10%)	02 (10%)
Normal	0	0	0

TOTAL 20 (100%) 20 (100%) 20 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 10, se presenta el estado de conformación física y vitalidad, de cada uno de los lechones que comprendían este grupo: en las primeras 24 horas 26% mostraban una condición física y vitalidad estable y sólo 74% presentaba un desmejoramiento de la misma; a las 48 horas siguientes fue aumentado hasta alcanzar un 80% con una vitalidad desfavorable y un 20% de lechones con mejoría y para las 72 horas presentaron una condición bastante desfavorable, con el 100% de los lechones decaídos.

Tabla 10. Estado físico en cuanto a conformación y vitalidad (C y V) de los lechones con diarrea colibacilar, que representaron el grupo control.

C y V	24 horas (T3).	48 horas (T3).	72 horas (T3).
Con mejoría	04 (26%)	03 (20%)	0
Decaído	11 (74%)	12 (80%)	15 (100%)
TOTAL	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 11 se presenta la variación en la consistencia de las excretas; el 100% de los lechones presentó durante las 72 horas una diarrea líquida completamente, sin manifestar ningún cambio clínico favorable.

Tabla 11. Consistencias de las heces (C H) de los lechones con diarrea colibacilar, que representaron el grupo control.

C H	24 horas (T3).	48 horas (T3).	72 horas (T3).
Liquidadas	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)
Pastosas	0	0	0
Normal	0	0	0
TOTAL	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

En la tabla 12 se observa que los lechones que no fueron sometidos a tratamiento presentaron una diarrea con un 45% moderada y el 55% leve, que al pasar del tiempo causo un atraso muy marcado en la recuperación general de los lechones.

Tabla 12. Frecuencia de evacuaciones (F E) de los lechones con diarrea colibacilar, que representaron el grupo control.

F E	24 horas (T3).	48 horas (T3).	72 horas (T3).
Moderadas	07 (45 %)	07 (45%)	07 (45%)
Leves	08 (55%)	08 (55%)	08 (55%)
Normal	0	0	0
TOTAL	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)

Fuente: Bracho, 2004.

Los resultados de la prueba de Kruskal – Wallis utilizando el programa de Statistic 4,0, señalan que al menos uno de los tratamientos produce un efecto significativo sobre las variables evaluadas (valores de $P < 0,05$), ver tabla 13.

Para hacer comparaciones entre tratamientos, se procedió a aplicar la prueba de Wilcoxon (Mann – Withney U) para pares de muestras independientes; el nivel de significancia empleado en la prueba fue el alfa corregido de Bonferroni, el cual es obtenido dividiendo el nivel de significancia utilizado en la prueba de Kruskal – Wallis entre el número de comparaciones posibles, en este caso se realizaron 3 comparaciones y el alfa empleado para la prueba de Kruskal – Wallis fue de 0,05; por lo tanto el alfa corregido de Bonferroni a emplear es 0,0017; los valores de P en la prueba de Wilcoxon menores o iguales que alfa corregido de Bonferroni son declarados significativos (Wayne, 1995).

Tabla 13. Prueba de Kruskal Wallis para las variables: Conformación y vitalidad (CV), consistencia de las heces (CH) y frecuencia de evacuación (FE) para cada tratamiento (T).

Variables	T	N	Medias	DE	Medianas	H
p						
CV	1	25	1,04	0,19	1,00	41,73 <0,0001
CV	2	20	2,00	0,00	2,00	
CV	3	15	2,00	0,00	2,00	
<hr/>						
CH	1	25	2,56	0,64	3,00	38,58 <0,0001
CH	2	20	1,00	0,00	1,00	
CH	3	15	1,00	0,00	1,00	
<hr/>						
FE	1	25	1,52	0,58	1,00	33,51 <0,0001
FE	2	20	2,90	0,31	3,00	
FE	3	15	2,47	0,52	2,00	

Valores de $p \leq \alpha=0,05$ son declarados significativos.

Fuente: Bracho, 2004.

Tabla 14. Comparaciones entre tratamientos mediante la Prueba de Wilcoxon para pares de muestras independientes en la variable conformación y vitalidad (C y V).

Clasificación	Variable	Grupo 1	Grupo 2	M(1)	M(2)	W	p(2 colas)
Tratamiento	C y V	LPO Activado	LPO sin Activar	1	2	740,00	<0,0001
Tratamiento	C y V	1	3	1	2	517,50	<0,0001

Valores de $p \leq \alpha = 0,0017$ son declarados significativos.

Fuente: Bracho, 2004:

La comparación entre los grupos 2 y 3 no se realizó debido a que son grupos idénticos.

Tabla 15. Comparaciones entre tratamientos mediante la prueba de Wilcoxon para pares de muestras independientes en la variable Consistencia de las heces (C H).

Clasificación	Variable	G1	G2	Mediana1	Mediana2	W	p(2 colas)
Tratamiento	C H	1	2	3	1	230,00	<0,0001
Tratamiento	C.H	1	3	3	1	135,00	<0,0001

Valores de $p \leq \alpha = 0,0017$ son declarados significativos.

Fuente: Bracho, 2004.

Tabla 16. Comparaciones entre tratamientos mediante la prueba de Wilcoxon para pares de muestras

Tratamiento	F.E	2	3	13	22	426,50	<0,0001
-------------	-----	---	---	----	----	--------	---------

independientes en la variable Frecuencia de Evacuación (F E).

Tratamiento	FE	1	2	1	3	727,00	<0,0001
--------------------	-----------	----------	----------	----------	----------	---------------	-------------------

Valores de $p \leq \alpha = 0,0017$ son declarados significativos.

Fuente: Bracho, 2004.

Los resultados evidencian que existen diferencias significativas entre los pares de tratamientos 1 y 2 para todas las variables estudiadas tomando en consideración que el tratamiento uno (1) resulto estadísticamente muy significativo en comparación al tratamiento dos (2) y el tratamiento (3). Mientras que los tratamientos 2 y 3 no difirieron estadísticamente en ninguno de los casos.

DISCUSIÓN

El SLPO activado en leche cruda de vaca permite que ésta mantenga sus condiciones naturales ya que logra mantener el pH y la acidez de la leche, condición que solo se logra cuando se impide la proliferación de bacterias, que desdoblán la lactosa y producen ácido láctico (Bracho, 2013; Bracho 1994), esta información coincide con lo reportado por FAO (1991), quien establece que el método de la lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno es un sistema antibacteriano natural presente en la leche y en la saliva humana.

La enzima lactoperoxidasa se halla en la leche de bovino y búfalo en concentraciones relativamente elevadas. Se sugiere que las actividades antibacteriales de la leche podrían estar relacionadas con la actividad de la peroxidasa, basada en la observación de la correlación en cuanto a termo resistencia entre la peroxidasa y las propiedades antibacteriales de la misma leche, las cuales se pierden por encima de ciertos tratamientos térmicos tal como lo establecieron Björk y Glaesson, (1980), Mullan *et al.*, (1980), Reiter, (1984), Kamau *et al.*, (1993) y Björk, (1993).

Para la activación del SLPO se usó una concentración de 0,06% de peróxido de hidrógeno, asociada a una concentración de 30 ppm de tiocianato de potasio, acorde con los reportes hechos por Bracho en (2004); resultando efectiva en el control de la diarrea colibacilar en un 96% del total de los lechones tratados.

Todos las muestras de heces proveniente de lechones con una edad comprendida entre cuatro (4) y nueve días (9) resultaron 100% positivos a la prueba de laboratorio para el aislamiento de *Escherichia coli* siguiendo un protocolo que culminó con una prueba de hemólisis a través de la cual se diagnosticó la presencia de una bacteria enteropatógena como lo es la *Escherichia coli*, resultado que concuerdan con lo reportado por: Fairbrother, (1992), Holm y Poulsen, (1996), Merck, (2002), Díaz, (2002), Sttjar, (2002) y Radostits et al., (2002). Con estos mismos lineamientos trabajaron Zamora et al., (2000), quienes recolectaron 497 muestras de heces diarreicas de cerdos lactantes, cumpliendo el mismo protocolo de laboratorio y obtuvieron el 80% de las pruebas positivas a *E. coli*. Este resultado también es compatible con la información aportada por. Pineda (1987) y Pineda et al., (1992), Mantecón y Ahumada (2002), quienes indicaron que la diarrea en cerdos, durante las primeras semanas de vida, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las granjas

porcinas del país. En un proceso complejo donde interactúan varios factores *Escherichia coli* enteropatógena ha sido incriminada como una de las causas determinantes de este proceso.

En las primeras 24 horas postratamiento todos los lechones con una edad comprendida entre cuatro (4) y nueve (9) días, tratados con el SLPO activado en la leche de vaca y que fueron positivos a la detección de *Escherichia coli*, evidenciaron mejoría clínica en el aspecto de las muestras de heces. A las 72 horas era mucho más notable ya que la proporción de animales con heces sólidas era superior a la de animales con heces pastosas y, no se encontraron animales con heces líquidas para este periodo pos tratamiento.

En búsqueda de fortalecer el resultado de la estadística descriptiva que se utilizó para las diferentes variables, que reportaron un 96% de efectividad para el sistema LPO en el control de la diarrea colibacilar se empleó la estadística no paramétrica Kruskal Wallis para las variables y tratamiento, así como la prueba de Wilcoxon para muestras independientes en los tratamientos y variables según Wayne (1995). Demostrando mediante ambos estadísticos que el sistema lactoperoxidasa en leche de vaca ejerce un efecto muy significativo en el control de la diarrea colibacilar en lechones.

CONCLUSIONES

Para determinar la diarrea colibacilar en lechones se aplicaron criterios clínicos sobre cada uno de los individuos que integraron el ensayo, posteriormente se hizo el aislamiento e identifico el agente causal de la diarrea, que resultó ser *Escherichia coli* en el 100% de las muestras.

La aplicación del sistema LPO activado en leche cruda de vaca como control de la diarrea colibacilar de cerdos lactantes resulta positivo ya que el cambio de consistencia de las heces en el lapso de 72 horas fue notable, hasta el punto de encontrar un 32% de lechones con heces pastosas, 60% con heces sólidas y solo 8 % con heces líquidas. En cuanto al resto de las variables evaluadas los resultados fueron: para la frecuencia de evacuaciones 56% normales, 40% leves y 4% moderada. Para la conformación y vitalidad se evidencian que el 96% de los lechones presentaron mejoría y un 04% continuo decaído.

Es importante señalar que sólo fueron evaluados lechones con un tiempo de vida comprendido entre 4 y 9 días, en donde los lechones sufren diarrea comúnmente en esta edad siendo de tipo colibacilar. Por este motivo se afirma que el sistema LPO es de mucha utilidad para el control de esta patología, ya

que representa una alternativa económica para los productores de cerdos.

Entre las condiciones para que una leche pueda ser utilizada en la activación de sistema LPO activado, está de manera primordial que provenga de una glándula mamaria completamente sana, sin síntomas o signos de mastitis.

Las pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal y Wallis, para establecer el efecto del tratamiento de activación del sistema y sin activación, demostraron diferencias significativas con una probabilidad de ($P \leq 0,001$) para el tratamiento de leche de vaca con el sistema LPO activado. Esto indica que con el tratamiento 2 y 3 no fue significativo por persistir la diarrea colibacilar en los lechones, demostrándose que el sistema LPO constituye una alternativa importante para el control de la diarrea colibacilar en lechones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRACHO-ESPINOZA, H. 2013 Ciencia y Tecnología de la Leche. 2^{da} Edición. Editorial Académica Española. ISBN-13:978—3-659-09813-3 Madrid. 124p.

BRACHO-ESPINOZA, H. 2004. Actividad enzimática de la lactoperoxidasa (LPO) en leches bovinas y caprinas y activación del sistema LPO, como un mecanismo para conservar leche en ausencia de refrigeración. Trabajo presentado ante la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda para ascender a la categoría de Profesor Titular. Coro – Venezuela. 110p.

BRACHO-ESPINOZA, H. 1994. Determinación cuantitativa de la actividad de la lactoperoxidasa en leche bovina. Trabajo para optar al Grado de Magister Scientiarum en Ciencias. Mención Ciencia y Tecnología en Alimentos. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela 72p

BJÖRCK, L & GLAESSON, O. 1980. Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Eschericia coli*. J. Dairy Sci.63:919-992.

BJÖRCK, L.1993. Determination of indigenous antimicrobial proteins of milk. Bulletin Int. Dairy Fed. N° 284-28

Comisión Venezolana de normas industriales. (COVENIN). 1997. Norma 658. Leche y sus derivados determinación de acidez titulable. Ministerio de fomento. Caracas, Venezuela.

DÍAZ, M. (2002). Diarrea neonatal porcina. Disponible en

http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X1999000200012&script=sci_arttext.

Consultado el 09-06-2006.

FAIRBROTHER, J. (1992). "Enteric Colibacillosis," En: Diseases of Swine, Seventh edition, page 489-495. **www.pfizerah.com.mx**. Consultado el 04-05-2017

HOLM, C., Y POULSEN, J. (1996). Etiología y control de las principales infecciones entéricas porcinas (1). Disponible en **http://www.colvet.es/Infovet/abr01/ciencias_v/articulo1.htm** . Consultado: el 05-06-06

KAMAU, D., DOORES, S. Y PRUITT, K. (1993). Antibacterial Activity of the Lactoperoxidase System. Word Animal. REV. 35:23-29.

LINDEN, G; HUMER, G. DESNOUVEAUX, R. y PICKCARD J. (1982). Aplicaciones de la dilución completa de la leche a la determinación de algunas actividades enzimáticas. Rev. LE LAIT. 62: 209 – 219.

MANTECON, T. Y AHUMADA, A. (2002). Diarrea mecánica de porcino en lactación y postdestete. Mundo Ganadero. 119:45.

MANUAL MERCK DE MEDICINA VETERINARIA, (2002). Quinta edición. Editorial Océano Grupo Editorial S.A., Barcelona, España. Pp.291-293.

MULLAN, W. WASTERHOUSE A. DAVIES, G. y WADE, V. (1980). The Production and storage stability of lactoperoxidase. Bull. Dairy Industries International. 45 (12):14-18.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). (1991). Boletín Técnico № 789 Documento CXS-70. Vigésimo segundo periodo de sesiones № 69-72-35-Va. Reunión.

PELCZAR, M.; REID, R. Y CHAN, E. (1982). Microbiología. Segunda edición. Editorial Mc Graw- Hill. 59 – 218p.

PRESCOTT, L.; HARLEY, J. Y KLEIN, D. (1999). Microbiología Veterinaria. Cuarta edición. Editorial Interamericana de España. 114 - 137p

PINEDA, Y. (1987). Multi-resistencia a los Antibióticos en Cepas de *Escherichia coli* Asociada a Casos de Diarrea en Lechones. Trabajo para obtener el Grado se Maestría - Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay Venezuela.78p

PINEDA, Y., GALLARDO, A., POLANCO, J., CLAVIJO, A. y MÉNDEZ, F. (1992). Etiología Bacteriana de la Diarrea en Cerdos de Venezuela. Rev. Veterinaria Tropical 17(1):41-52.

POUTERL, B. Y REINARD, B. 1981. California Mastitis Test. Guide of selective Dry Cow Therapy. Journal Dairy Sci. 64(2): 241 – 248.

PÚTTER, J. 1974. Peroxidase in methods of enzymatic analysis. Vol. Two Second Edition. Edited by Hans Ulrich Bergmeyer. Academic Press. Inc.

RADOSTITS, O.; GAY, C.; BLOOD, D.; HINCHCLIFF, K. (2002). Medicina Veterinaria. Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. Novena Edición. Editorial Mc GRAW-HILL. Interamericana. España. p 926

REITER; B. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. Journal of food protección. 47: 74

STTJAR, M, (2002). Enfermedades entéricas en porcino disponible en,
http://www.colvet.es/infovet/abr00/ciencias_v/articulo1.htm
Consultado el 04-05-2017

WAYNE, D. (1995). Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta Edición. Editorial Limusa Wiley, pp. 755.

ZAMORA, J., REINHARDT, G, POLETTE, M. ORELLANA, C. (2000). *Escherichia coli* aislada de fecas cerditos diarreicos: Patrones de adherencia a células HEP-2. Instituto de Microbiología, Facultad de ciencias Universidad Austral. Valdivia, Chile. Arch, Med.Vet. Vol. 32. N° 2 Disponible en:
<http://www.scielo.cl/scielo.php>. Consultado el 04-05-2016.

ISBN: 978-980-245-106-7



9 789802 451067



Profesor Universitario Jubilado, Categoría Titular en UNEFM. Docente-Investigador en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos con materias primas de origen animal y vegetal, específicamente: manejo, composición, transformación y conservación de los alimentos. Investigación y desarrollo de nuevos productos alimenticios, de la mano con la inocuidad y calidad de los alimentos.

En esta cuarta edición se estudió la variación del volumen de actividad enzimática de la lactoperoxidasa (LPO) y del tiocianato (SCN) en la leche de vacas y cabras en función del mestizaje, lactancias, periodo de lactación y envejecimiento de la leche y activación del sistema enzimático: Lactoperoxidasa-peróxido de hidrógeno-tiocianato de potasio (SLPO), como un mecanismo para alargar la vida útil de la leche a temperatura ambiente sin modificar su calidad y valor nutritivo, así mismo, se buscó afianzar las perspectivas de este Sistema en el control de las enfermedades de la ubre (mastitis) y de la diarrea colibacilar en lechones.