

Proyecto de caracterización de la leche cruda identificando la presencia del Glicomacropéptido de Caseína c-GMP.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Anexo 2 - 2020



Presidente

Camilo Fernández de Soto

Vicepresidente de Agroindustria

Amira del Pilar Ortiz Olaya

Gerente de Agroindustria

Fabián Camilo Acosta Puentes

Profesional Senior

Sector Agroindustria

Jenifer Yaneth Guzmán Gualteros

Operador Técnico

Consortio Consultoría PTP (Biotrends Laboratorios S.A.S y RyG Asesorías).

Murcia F., Prieto P., Ávila O., Bernal O.,
Murcia A., Amaya C., Morales M., Arias W

Edición

Jenifer Guzmán
Profesional Lácteo

Diseño

Leonardo Pérez
Profesional comunicaciones

Colombia Productiva
2020

Anexo 2 – Artículo científico

Revisión y validación de método por medio de cromatografía líquida de alta eficacia para identificar el contenido de glicomacropéptido de caseína en leche cruda de bovino.

Bogotá, Colombia

www.colombiaproductiva.com

Revisión y validación de método por medio de cromatografía líquida de alta eficacia para identificar el contenido de glicomacropéptido de caseína en leche cruda de bovino.

Murcia F., Prieto P., Ávila O., Bernal O., Murcia A., Amaya C., Morales M., Arias W., y Guzman J.

Consortio consultoría PTP, Biotrends laboratorios SAS, R y G Asesorías S.A.S, Colombia Productiva cuya vocera y administradora es la Fiduciaria Colombiana de Comercio Exterior Fiducoldex S.A, Bogotá Colombia.

Resumen

En Colombia la información de dominio público respecto a las metodologías de caracterización del lactosuero es limitada, restringiendo la posibilidad de acceder a ellas por diferentes actores de la cadena quienes buscan implementar técnicas de control para disminuir el riesgo de fraude alimentario. Se realiza la revisión y validación del método de cromatografía de alta eficacia con detector UV para determinar el glicomacropéptido de caseína (GMP) en leche cruda de bovino, proteína usada como indicador de adulteración en países como Brasil¹ y Ecuador². Una muestra de 10mL de leche cruda es precipitada por medio de ácido tricloroacético (TCA) al 24%, empleando para ello ultrasonido por un tiempo de 20 minutos, proceso seguido por filtración. La fracción recolectada aseguró la separación del GMP de la caseína para luego inyectar una cantidad suficiente de manera directa al cromatógrafo líquido.

La determinación cromatográfica permitió el análisis en un tiempo de 30 minutos identificando la presencia de la proteína en un tiempo de retención de $12,9 \pm 0,5$ minutos. Las características de desempeño del método se obtuvieron a través de ejercicio de validación

¹ Instrução Normativa SDA nº 69 de 13/12/2006 criterios para evaluar la calidad de la leche fresca, concentrada y en polvo, reconstituida, con base en el método analítico fisicoquímico oficial denominado "Índice CMP".

² NTE INEN 2401:2014 Determinación de suero de quesería en leche mediante el análisis de glicomacropéptidos por cromatografía líquida de alta presión.

del mismo, obteniendo los siguientes resultados: un porcentaje de recuperación de 99,97%, la linealidad evaluada por mínimos cuadrados, obtuvo resultados satisfactorios ($R^2 > 0,95$) para todo el rango de trabajo determinado; la precisión fue evaluada sobre réplicas, analizadas de manera independiente desde la preparación de la muestra hasta la lectura de resultados; el análisis de los valores para la precisión arrojó una desviación relativa porcentual %RSD menor a 5,3%. Se concluye que el método al final del ejercicio exhibe atributos para el fin previsto.

Palabras claves: Glicomacropéptido de caseína c-GMP, Cromatografía líquida de alta eficacia, lactosuero, fraude alimentario, contenido basal.

Abstract

In Colombia, information in the public domain regarding the whey characterization methodologies is limited, restricting the possibility of accessing them by different actors in the chain that seek to implement control techniques to reduce the food fraud risk. This research used high efficiency chromatography with a UV detector as a method to characterize casein glycomacropéptide in raw bovine milk, a protein used as an indicator of adulteration in countries such as Brazil and Ecuador. A 10mL sample of raw milk is precipitated by means of 24% trichloroacetic acid (TCA), using ultrasound for a period of 20 minutes, a process followed by filtration. The collected fraction ensured the separation of c-GMP from casein to then inject a sufficient amount directly into the liquid chromatograph.

The chromatographic determination will reach the analysis in a time of 30 minutes, identifying the presence of the protein in a retention time of 12.9 ± 0.5 minutes. The performance characteristics of the method were obtained through the method validation exercise obtaining the following results: a recovery percentage of 99.97%, the linearity evaluated by "least squares" obtained satisfactory results ($R^2 > 0,95$) for the entire determined working range; the precision was put into service on replicas, analyzed independently from the preparation of the sample to the reading of the results, the values analyzed for the precision obtained values of percentage relative deviation % RSD to 5.3%. It is concluded that the method at the end of the exercise exhibits attributes for the intended purpose.

Keywords: Casein glycomacropéptide GMP, High Pressure Liquid Chromatographic, Whey milk, Fraud food.

Introducción

La cadena láctea en Colombia atraviesa diferentes problemas que no han podido ser resueltos, existiendo aun vacíos normativos que limitan el control de prácticas no permitidas, como la adulteración de la leche con lactosuero, promoviendo así la competencia desleal que conlleva a diferencias no solo en la calidad del producto, sino en la variación del precio, por lo que se hace necesario reglamentar las especificaciones técnicas de la leche en relación a la adición de lactosuero y establecer métodos efectivos de medición.

En Colombia el Decreto 616 de 2006 establece los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendia, importe o exporte en Colombia; en su capítulo IV, artículo 14 se indica taxativamente la prohibición de adición de lactosueros a la leche en todas las etapas de la cadena productiva y la comercialización en el territorio nacional de productos destinados al consumo humano con la denominación “leche”, cuando presenten modificaciones en su composición natural o adición de sustancias no autorizadas como sueros lácteos, (Minsalud, 2006). Sin embargo, en este no se establecen límites, cantidades o concentraciones de lactosuero que permitan establecer la adulteración de la leche para dar cumplimiento al mismo.

En los últimos años se ha podido evidenciar la posible adición de lactosuero como adulterante en leche principalmente usado para aumentar el volumen y así mismo la ganancia económica. Al ser el suero un componente natural de la leche éste se mezcla con facilidad gracias a sus propiedades coligativas y no puede ser diferenciado fácilmente con pruebas básicas de control (Galindo et al, 2006). Dicho uso presenta varios inconvenientes, entre los principales se encuentra el hecho de que no se conocen las características de producción de lactosuero, comprometiendo así la calidad microbiológica e higiénica del producto al no contar con evidencias claras, que permita establecer si ese lactosuero tuvo alguna higienización, las propiedades tecnológicas de las proteínas del lactosuero no permiten tener los mismos rendimientos en la obtención de productos lácteos, y también promueve una competencia desleal en precios y un engaño finalmente al consumidor al no ser un producto acorde con la definición de leche según el Decreto 616.

Una de las proteínas que se presenta de forma soluble en el lactosuero es el Glicomacropéptido de caseína (CMP o c-GMP) el cual corresponde del 15-20% de las proteínas de suero (Sharma, 2019). Es un péptido hidrofílico (contiene alrededor de 102-169 residuos de aminoácidos) de kapa-caseína que brinda estabilidad a las micelas de caseína en la leche; se produce por acción del cuajo sobre la kapa-caseína en la elaboración del suero, liberando el c-

GMP al suero. El c-GMP es único dentro de las proteínas solubles del suero, esto debido a que tiene dentro de su estructura, un oligosacárido atado a la cadena del péptido, así como un aporte significativo de fenilalanina, triptófano y serina. También tiene altos niveles de aminoácidos de cadena ramificada como los son leucina, isoleucina y valina (Sharma, 2019), es por ello que diversos autores sugieren el c-GMP como marcador e indicador de adición de lactosuero en leche, y los métodos analíticos se han basado en determinar la concentración de esta proteína. Para ello se han empleado métodos como la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta eficacia.

La puesta en marcha de la técnica por cromatografía de alta eficacia para la determinación de c-GMP, resulta relevante para identificar la concentración de la proteína en su estado natural dentro de la leche cruda, debido a que una fracción es liberada por procesos naturales de degradación relacionadas con actividad bacteriana o por procesos enzimáticos desencadenados por las prácticas asociadas a la manipulación y almacenamiento. Con esta metodología de base se buscará establecer valores de referencia iniciales que constituyan un punto de partida para dar un marco de referencia respecto al análisis del contenido de c-GMP en la leche cruda de bovino. El método de referencia usado para este análisis fue basado en el método

analítico fisicoquímico oficial de Brasil publicado en la Instrucción Normativa N° 68 de 2006 "Índice CMP".

Finalmente hay que indicar que este proyecto fue cofinanciado con recursos de la Unión Europea operados por el Patrimonio Autónomo Colombia Productiva cuya vocera y administradora es la Fiduciaria Colombiana de Comercio Exterior Fiducoldex S.A, entidades adscritas al Ministerio de Comercio, Industria Turismo en el marco del contrato 0302019 y bajo la convocatoria 566 de 2019.

Materiales y métodos

Reactivos

Los reactivos empleados en la determinación analítica fueron Ácido tricloroacético (TCA) p.a., fosfato de potasio diácido (KH_2PO_4) p.a., fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) p.a., sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) p.a con pureza no menor a 98%. Adicionalmente se empleó agua grado tipo 1 para HPLC, Lacprodan concentrado proteico (fig.1) Lote 4J1493. Marca: Davisco Foods, Arla Foods, cuyo certificado de análisis indica pureza: 76%.

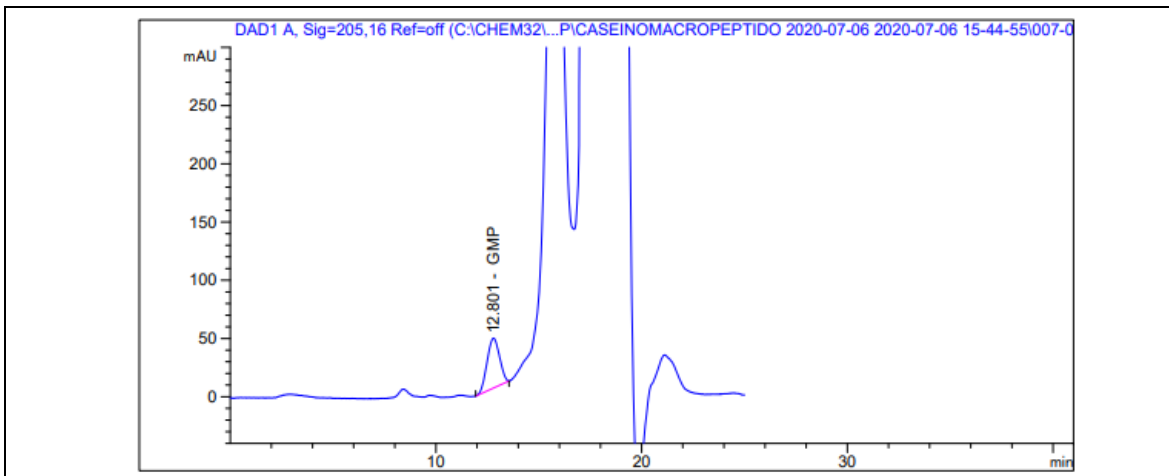


Figura 1. Cromatograma típico de estándar Lacprodan empleado en la cuantificación de c-GMP.

Toma de muestras para análisis

Cada muestra fue tomada de una cantina de leche fresca y recién ordeñada, empleando para ello envase estéril y posterior conservación con peróxido de hidrógeno al 0,2%, la muestra una vez recolectada se aseguró mediante la condición de refrigeración (4°C +/- 2°C) hasta el traslado y llegada de la muestra a las instalaciones de Biotrends Laboratorios S.A.S, lugar donde fueron realizados los ensayos.

Método de precipitación

El acondicionamiento de la leche refrigerada se realizó sumergiendo la muestra en baño maría a 30°C por un tiempo de 10 minutos, se agitó ocasionalmente el recipiente (invirtiendo 5 o 6 veces de manera suave). Se pesaron 10,0 mL de leche acondicionada en un tubo con capacidad de 50

mL, posteriormente se adicionó al tubo que contenía la leche, 5 mL de TCA al 24%. La mezcla fue sometida a ultrasonido por un tiempo de 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó el filtrado a través de papel de filtro cuantitativo y se aseguró la recolección de 3 mL de muestra, luego se transfirió una cantidad suficiente a un vial para la inyección directa al cromatógrafo y posterior cuantificación (fig.2).

Análisis por cromatografía líquida de alta Eficacia (HPLC-DAD)

Se empleó cromatógrafo líquido detector UV de arreglo de diodos capaz de operar a 205nm, con automuestreador que inyecta entre 20-100 microlitros. La columna de exclusión por tamaño fue una columna Zorbax GF-250 Analytical 9.4 x 250mm 4-Micron. La fase móvil empleada fue una

solución tampón pH 6,0 la cual fue realizada disolviendo 1,74 g de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄), 12,37 g de fosfato de potasio diácido (KH₂PO₄) y 21,41 g de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), en 700 ml de agua grado HPLC, posteriormente se ajustó el pH a 6,0 usando solución de K₂HPO₄ 0,1M, se completó a 1L con agua tipo 1 y por último se filtró la solución por una membrana de 0,45µm. Para la detección de la molécula, se empleó un detector de arreglo de diodos en una longitud de onda de 205nm. En la siguiente tabla se observan las condiciones de las corridas

Tabla 1. Condiciones de la cromatografía por exclusión por tamaño

Condición	Parámetro
Volumen de inyección	50 µL
Flujo de la fase	1 mL/min
Temperatura del horno	20°C
Tiempo de retención	12,9 ± 0,5 minutos
Tiempo total de análisis	30 minutos

El software Chemstation B 03.01 fue la herramienta empleada para el tratamiento de datos y el cálculo de los parámetros de integración.

Procedimiento de validación del método

La validación del método de análisis para la determinación del glicomacropéptido de caseína (c-GMP) en leche por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se basó en la recomendaciones del ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Los criterios establecidos para dar cumplimiento a los diferentes parámetros evaluados, fueron tomados del Official Methods of Analysis AOAC, los cuales corresponden para la precisión un RSD menor o igual a 5,3% para estándares y muestras preparadas independientemente, para la exactitud un porcentaje de recuperación entre 80 y 110%. Los parámetros aplicados para la validación del método fueron, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión del sistema instrumental, precisión del método, precisión intermedia, veracidad, robustez, intervalo de trabajo e incertidumbre.

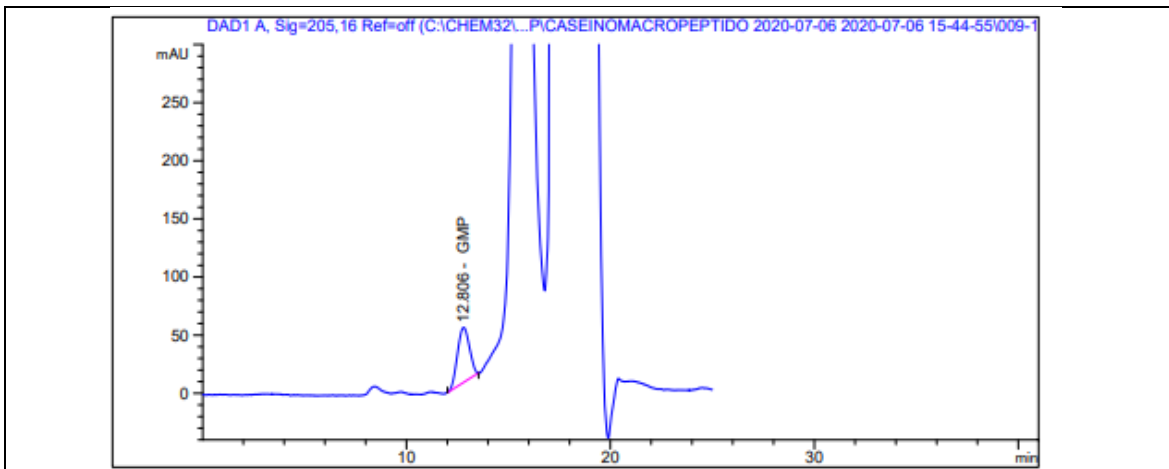


Figura 2. Cromatograma típico de muestra determinada por método de precipitación ultrasónico.

Resultados y discusión

Linealidad

Se realizó una curva de calibración con las concentraciones 0, 10, 30, 50, 70, 100, 200 mg/L de c-GMP (rango bajo) y 100, 700, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 mg/L de c-GMP (rango alto) se evaluó cada punto de la curva con dos réplicas por punto. Para cada uno de los rangos trabajados se presentó un coeficiente de determinación lineal mayor o igual a 0,95, de esta forma para rango bajo se obtuvo un $R^2 = 0,99$ (fig.3) y para rango alto el valor fue de R^2

$=0,98$ (fig.4); por lo tanto se demostró que existe una alta correlación entre la concentración del c-GMP y el área del pico cromatográfico, se afirma que de esta manera la ecuación de la curva de calibración del método fue capaz de explicar la respuesta instrumental a partir del de la concentración de c-GMP en los estándares trabajados.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se estableció a una concentración de 20 mg/L debido a que a 10 mg/L en un primer análisis, no se obtuvo una adecuada repetibilidad (el % de RSD fue de 54,7%).

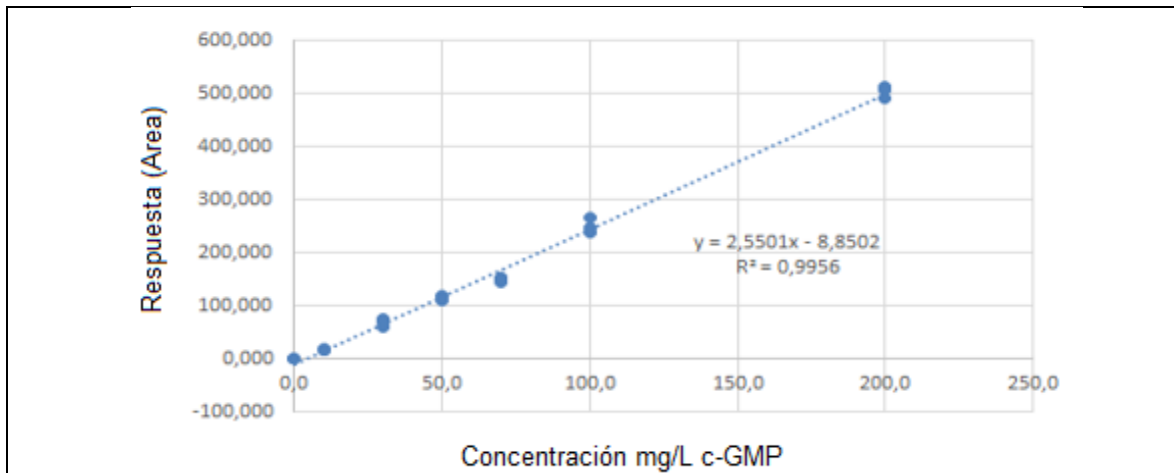


Figura 3. Linealidad, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para rango bajo.

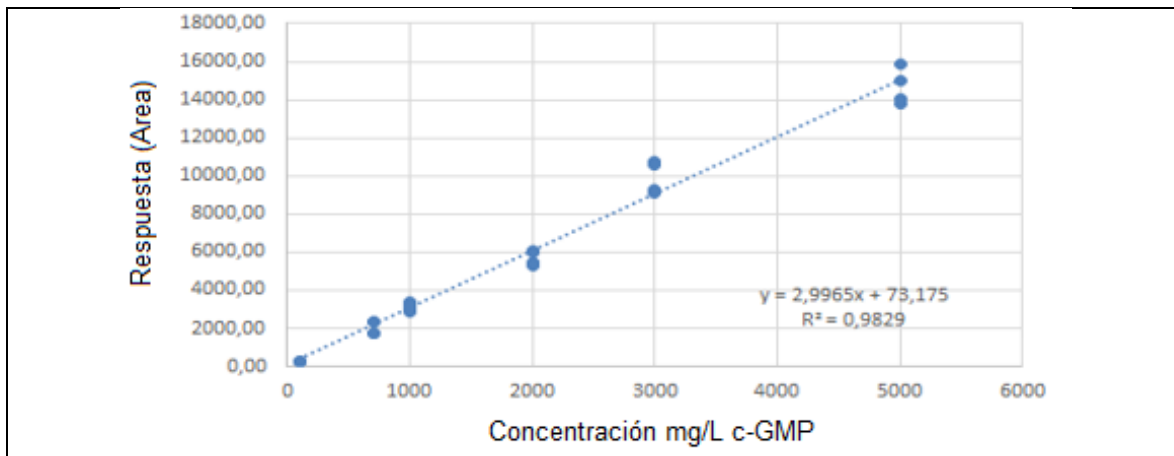


Figura 4. Linealidad, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para rango alto.

Este estándar a concentración de 20 mg/L, fue preparado e inyectado 10 veces para obtener resultados independientes bajo condiciones de repetibilidad (mismo analista, mismo día). Se evaluó que los resultados tuvieran una repetibilidad adecuada (RSD menor o igual al 5,3% y un porcentaje de recuperación entre 80 y 110%, de acuerdo a la referencia tomada como base AOAC 2019)

Para la concentración analizada del límite de cuantificación se obtuvo un % de recuperación de 103,2% y un RSD de 4,0%, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos por el método (AOAC 2019 apéndice F), por lo que se establece como límite de cuantificación la concentración de 20,0 mg/L.

Precisión

Se analizaron los criterios de precisión del sistema instrumental, precisión del método (bajo condiciones de repetibilidad mismo analista mismo día) y precisión intermedia (bajo condiciones de reproducibilidad) (tabla 2). La precisión del sistema instrumental se determinó analizando estándar bajo (60,0 mg/L), estándar medio (500 mg/L), estándar alto (4.000 mg/L). La precisión del método e intermedia incluyo los estándares bajo, medio y alto y una muestra de leche cruda (matriz) sin embargo las muestras se analizaron sobre réplicas, es decir la muestra o estándar se analizó de manera independiente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados).

En la precisión intermedia se evaluó el cambio de analista. Se trabajó según el modelo presentado en ICH Q2 (R1)³ donde se analizaron 6 réplicas de muestras y estándares. Con los resultados obtenidos de la precisión del sistema instrumental y precisión del se encontró que el método es repetible ya que los valores de RSD fueron menores a 5,3% para todo el rango y la muestra evaluada. Para la precisión intermedia se realizó una comparación estadística por medio de un Análisis de Varianza (Anova) con el fin de evaluar si existían diferencias significativas aún cuando se cambiara el analista; para cada grupo de datos evaluados se obtuvo que el F calculado en todos los casos, fue menor al F crítico, por lo tanto, se concluye que el método utilizado es repetible para ambos analistas (tabla 2)

Tabla 2. Resultados del ejercicio de precisión intermedia. Las unidades de los valores obtenidos son en mg/L de c-GMP.

ESTÁNDAR BAJO 60 mg/L		ESTÁNDAR MEDIO 500 mg/L		ESTÁNDAR ALTO 4000 mg/L		MUESTRA	
Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
58,37	63,31	536,20	480,44	4000,52	4214,97	153,29	151,93
60,51	56,31	481,07	484,22	4188,64	3937,48	157,09	166,49
60,66	58,74	485,93	468,63	4055,55	4092,76	150,03	151,17
57,28	65,14	493,16	472,96	4024,72	3934,81	157,00	167,45
61,83	63,76	501,51	468,31	4059,59	3949,70	152,85	143,79
63,93	63,07	493,70	507,76	4186,84	3969,42	158,10	146,35

³ European medicine Agency, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION

OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY

Veracidad

Para la evaluación de la veracidad se realizó el análisis sobre réplicas de un estándar bajo (60,0 mg/L), estándar medio (500 mg/L) y del estándar alto (4.000 mg/L) (tabla 3). Se analizaron 6 réplicas por cada analista que participó en el ejercicio de validación, obteniendo para el

análisis de veracidad un total de 12 datos analizados.

La veracidad se evaluó como porcentaje de recuperación hallado en cada réplica analizada.

Como criterio de aceptación el porcentaje de recuperación debía encontrarse entre el 80 y 110 %.

Tabla 3. Resultados de la evaluación de veracidad. Para cada conjunto de datos se obtuvo un porcentaje de recuperación entre 80 a 110% por lo tanto el método utilizado ensayo de c-GMP para el intervalo trabajado, cumple con la veracidad requerida por el método bajo las condiciones del laboratorio. Las unidades de los valores obtenidos son en porcentaje relativo (%).

ESTÁNDAR BAJO 60 mg/L		ESTÁNDAR MEDIO 500 mg/L		ESTÁNDAR ALTO 4000 mg/L	
RESULTADO (mg/L)	Recuperación (%)	RESULTADO (mg/L)	Recuperación (%)	RESULTADO (mg/L)	Recuperación (%)
58,37	97,3%	536,20	107,2%	4000,52	100,0%
60,51	100,9%	481,07	96,2%	4188,64	104,7%
60,66	101,1%	485,93	97,2%	4055,55	101,4%
57,28	95,5%	493,16	98,6%	4024,72	100,6%
61,83	103,1%	501,51	100,3%	4059,59	101,5%
63,93	106,6%	493,70	98,7%	4186,84	104,7%
63,31	105,5%	480,44	96,1%	4214,97	105,4%
56,31	93,8%	484,22	96,8%	3937,48	98,4%
58,74	97,9%	468,63	93,7%	4092,76	102,3%
65,14	108,6%	472,96	94,6%	3934,81	98,4%
63,76	106,3%	468,31	93,7%	3949,70	98,7%
63,07	105,1%	507,76	101,6%	3969,42	99,2%

De acuerdo con los resultados obtenidos (tabla 3), para las concentraciones evaluadas, el porcentaje de recuperación estuvo dentro del criterio de aceptación. Por lo tanto, el método de ensayo para la determinación de c-GMP en leche cruda, arroja resultados veraces en todo el rango trabajado.

Robustez

Para evaluar la robustez de la técnica se realizó una comparación de los resultados obtenidos en leche sin adición y con adición de preservante. El preservante utilizado fue peróxido de hidrógeno al 0,2% (0,67mL de H₂O₂ al 30% por cada 100 mL de leche). Se realizó prueba F para estimar si las varianzas de las curvas en las dos condiciones diferentes son homogéneas y posteriormente se realizó una prueba t-student para evaluar si hay diferencias significativas en las curvas obtenidas.

En la prueba F aplicada a las curvas obtenidas, se obtuvo un $F_{\text{calculado}}$ (0,52) < $F_{\text{crítico}}$ (2,47), por lo tanto, la varianza de las dos pendientes obtenidas es homogénea. Para establecer si existía diferencia significativa entre los dos tratamientos (con adición y sin adición de preservante) se realizó una prueba t-student. Se encontró que $t_{\text{calculado}}$ (1,49) < $t_{\text{crítico}}$ (2,02), por lo tanto, las curvas obtenidas (con adición y sin adición de preservante) no son diferentes significativamente.

Intervalo de trabajo

El intervalo se define entre el límite de cuantificación hallado experimentalmente en el ejercicio de la validación hasta la muestra o estándar más alto trabajado durante el proceso.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se establece que el intervalo de trabajo para el ensayo de c-GMP y teniendo en cuenta la pureza del estándar utilizado (76%) en leche líquida es de 15,2 mg/L a 3.800 mg/L.

Incertidumbre

La incertidumbre fue estimada de acuerdo con lo establecido por la guía para la expresión de la incertidumbre de medida – GUM. Se calcularon de manera independiente la incertidumbre asociada de la curva de calibración que incluía el análisis de residuales de la curva obtenido experimentalmente y el material de referencia (fig. 5) ($\mu_{\text{combinada}}=2,0725$), la incertidumbre asociada a la preparación de la muestra ($\mu_{\text{combinada}}=0,00014057$), incertidumbre a partir de los datos obtenidos de la validación (Repetibilidad instrumental $\mu_{\text{combinada}}=0,012$, precisión intermedia $\mu_{\text{combinada}}=0,0116$). La incertidumbre expandida calculada considerando un nivel de confianza del 95% y un factor de cobertura de $K=2$ fue de 4,1mg/L de c-GMP.

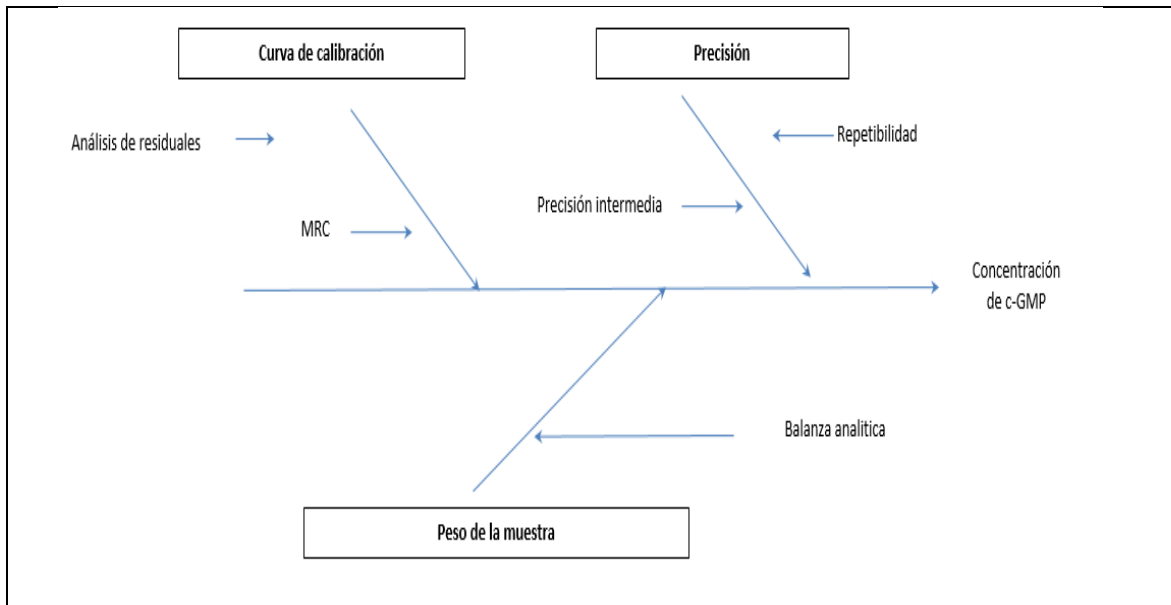


Figura 5. Identificación de las fuentes de incertidumbre por medio del diagrama causa – efecto.

Conclusiones

El método para la determinación de c-GMP en leche cruda fue revisado y validado por medio de cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV y columna de exclusión por tamaño. Los resultados de la validación del método mostraron que se cumplen con los criterios de linealidad ($R^2 > 0,95$) para el rango alto y bajo, precisión del sistema instrumental, precisión del método ($\%RSD < 5,3\%$), límite de cuantificación y veracidad (porcentaje de recuperación entre 80-110%), adicionalmente se verificó cumplimiento en el criterio de robustez y precisión intermedia.

El método puede ser empleado para el seguimiento y control en toda la cadena de

producción: como criterio de selección de proveedores, seguimiento y verificación a los mismos, verificación de la leche cruda en el acopio. Aplica para leche cruda, sin ningún tipo de higienización o adición de estabilizantes.

La cuantificación de c-GMP por medio de cromatografía líquida de alta eficacia por exclusión por tamaño es una metodología apropiada para las industrias, debido a su corto tiempo de análisis, facilidad en la preparación de estándares y muestras, adecuada respuesta instrumental, así como de las condiciones de precisión y reproducibilidad.

La técnica de cromatografía revisada y validada, se convierte en una técnica que se

alinea con metodologías de control oficiales en países como Brasil. Esta metodología cuantifica c-GMP como indicador de adulteración de lactosuero en concentraciones entre 15,2 mg/L a 3.800 mg/L.

Los resultados del ejercicio de validación logran demostrar que, en las condiciones específicas del laboratorio, se comporta según las características para el uso previsto y responde a las necesidades de determinación de c-GMP por medio de cromatografía líquida de alta Eficacia con columna de exclusión por tamaño.

Bibliografía

Antonio, L., Rubio, S., Ortiz, R. B., & Montoya, M. (2013). Uso del suero de leche en alimentos y sus sustitutos Contenido.

Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013a). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *The Science of the Total Environment*, 445-446, 385-96. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>

Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013b). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *The Science of the Total Environment*, 445-446, 385-96. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>

Europeans medicine Agency, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures:

Text and Methodology, Note For Guidance On Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (CPMP/ICH/381/95), recuperado desde https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.

Instrucción normativa No 68 generada por el Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete do Ministro, Brasil, 12 de diciembre de 2006.

Instrucción normativa No 69 (Instrução Normativa Nº 76) generada por el Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete do Ministro, Brasil, 13 de diciembre de 2006.

Jaramillo, A. R., & Segura, L. y A. M. A. (2012). Análisis del Mercado de la Leche y Derivados Lácteos en Colombia (2008 – 2012).

Laboratório Nacional agropecuário – LANAGRO/RS MAPA, Laboratório de produtos de origem animal – MAPA/SDA/CGAL - Código: MET POA/04/03/01 Fecha de emisión: 13/02/2014. Página de 1 a 11.

Michaelidou A, Steijns J. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides *International Dairy Journal*. 2006 Nov;16(11):1421-1426. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.06.018.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1–14.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>

Pereira, P.C. (2014) Milk Nutritional Composition and Its Role in Human Health. *Nutrition*, 30, 619-627.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>

Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68.
<http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>

Rev. Cient. (Maracaibo) v.16 n.3 Maracaibo mayo 2006 Estandarización de la

detección del Glicomacropéptido Por Page-SDS como índice de Adulteración de Leche, Luz Mila Galindo-Amaya¹, Emiro Valbuena-Colmenares² y Evelin Rojas-Villaruel², ¹Departamento de Química, Facultad de Humanidades y Educación. ² Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Apartado 15252. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. E-mail: evalbuena@luz.edu.ve

Sharma Ranjan, Chapter 17 - Whey Proteins in Functional Foods, Editor(s): Hilton C. Deeth, Nidhi Bansal, *Whey Proteins*, Academic Press, 2019, Pages 637-663, ISBN 9780128121245, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00018-7>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128121245000187>).



Ministerio
de Comercio
Exterior y Turismo
Mincomercio



El progreso
es de todos

Mincomercio

2021