

**PROPUESTA PARA EL CONTROL DE LA ADULTERACIÓN EN LECHE
CRUDA CON LA ADICIÓN DE LACTOSUERO POR MEDIO DE UNA
CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) EN ALQUERIA**

ANGELA VIVIANA HERNANDEZ CORDON
CESAR STEVEN PEÑA MONROY

FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA
BOGOTA D. C.
2016

**PROPUESTA PARA EL CONTROL DE LA ADULTERACIÓN EN LECHE
CRUDA CON LA ADICIÓN DE LACTOSUERO POR MEDIO DE UNA
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) EN ALQUERIA**

ANGELA VIVIANA HERNANDEZ CORDON
CESAR STEVEN PEÑA MONROY

Proyecto integral de grado para optar el título de
INGENIERO QUIMICO

Director
Mario Alejandro Rodríguez
Ingeniero Químico

Asesora
Elizabeth Torres
Ingeniera Química

FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA
BOGOTA D. C.
2016.

Nota de aceptación

Elizabeth Torres

Álvaro Bermúdez

Oscar Lombana

Bogotá D.C. Noviembre del 2016

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DIAZ

Vice-rector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCIA-PEÑA

Vice-rectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCIA-PEÑA

Decano Facultad de Ingenieria

Dr. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa Ingenieria Quimica

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los Autores.

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo primero a Dios quien inspiro nuestro espíritu para concluir este trabajo de grado de Ingeniería Química. A nuestros padres quienes nos dieron la oportunidad de estudiar y su apoyo incondicional durante todo este proceso en el que muchas veces nos quisimos dar por vencidos y nunca nos lo permitieron. A nuestros profesores por compartir con nosotros todo el conocimiento con el que pudimos dar por terminado nuestro pregrado.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo queremos agradecer a la Pontificia Universidad Javeriana por abrirnos las puertas de la institución para desarrollar este trabajo de grado, junto con el profesor Ricardo Vera Bravo y Alejandro Reyes quien siempre estuvieron dispuestos a ayudarnos y enseñarnos todo lo que necesitáramos para este. La empresa Productos Naturales de la Sabana S.A. en especial a Mario Rodríguez López por confiar en nosotros y contar con su apoyo incondicional durante todo este proceso, a el XIII congreso latinoamericano de microbiología e higiene de alimentos por darnos la oportunidad de presentarnos y el otorgamiento al Premio ACTA 40 años como mejor trabajo de pregrado.

CONTENIDO

	pag.
INTRODUCCION	18
1. GENERALIDADES	22
2. IMPLEMENTACION DE LA METODOLOGIA	27
2.1 SELECCIÓN DE CONDICIONES	28
2.1.1 Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia.	28
2.1.2 Reactivos.	28
2.1.3 Preparación de las muestras leche cruda	29
2.1.4 Condiciones cromatográficas	31
2.2 ADULTERACIONES DE MUESTRAS	33
2.3 OBTENCIÓN LACTOSUERO	33
2.3.1 Lactosuero estándar	33
2.3.2 Lactosuero casero	31
2.3.3 Lactosuero en polvo	33
2.3.4 Lactosuero liofilizado	33
2.3.5 Preparación de muestras con lactosuero	34
2.4 COAGULACION ENZIMATICA	34
2.4.1 Preparación de lactosuero variando concentraciones	34
2.4.2 Muestras	35
2.5 MADURACION DE LECHE	35
2.6 LÍMITE DE DETECCIÓN	35
2.7 NIVELES DE PRECISIÓN	36
2.7.1 Reproducibilidad	36
2.7.2 Repetibilidad	36
3. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA	37
3.1 SELECCIÓN DE CONDICIONES	37
3.1.1 Columna	37
3.1.2 Flujo e inyección	37
3.1.3 Tiempo de corrida	37
3.1.4 Tiempo de adulteración	38
3.2 ADULTERACIONES DE MUESTRAS	39
3.3 OBTENCION DE LACTOSUERO	41
3.4 COAGULACION ENZIMATICA	44
3.5 MADURACION DE LA LECHE	47
3.6 LIMITE DE DETECCION	48
3.7 NIVELES DE PRECISION	51
3.7.1 Reproducibilidad	51
3.7.2 Repetibilidad	54

4.	COSTOS DE IMPLEMENTACION DE LA PROPUESTA	62
4.1	COSTOS INDIRECTOS	62
4.1.1	Costos de reactivos	62
4.1.2	Costos de insumos	63
4.1.3	Costo agua tipo I	64
4.1.4	Costos columna y pre columna	64
4.2	COSTOS DIRECTOS	65
4.2.1	Mano de obra supervisión	65
4.2.2	Mano de obra operación	65
4.2.3	Mantenimiento	65
4.2.4	Uso de equipos	65
4.2.5	Implementacion de la propuesta en la empresa	64
5.	CONCLUSIONES	69
6.	RECOMENDACIONES	70
	BIBLIOGRAFIA	71
	ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Reactivos y grado de calidad.	26
Tabla 2. Pesos de leche cruda y lactosuero a diferentes porcentajes de adulteración.	37
Tabla 3. Corrección de los pesos en tubos cóncavos para una centrifugación más adecuada.	38
Tabla 4. Pesos de leche cruda; y de diferentes procesos y tratamientos para la obtención del lactosuero adulterados al 10% peso a peso.	40
Tabla 5. Corrección de pesos de los diferentes procesos y tratamientos para la obtención de lactosuero para una centrifugación más adecuada.	40
Tabla 6. Pesos de leche cruda y lactosuero variando las concentraciones de rennina (cuajo) por duplicado.	42
Tabla 7. Corrección de pesos de muestras de concentración de rennina (cuajo) variando el porcentaje de adulteración, por duplicado, para una centrifugación más adecuada.	43
Tabla 8. Pesos de leche cruda y lactosuero en las pruebas de límite de detección en rangos de 0% a 2,5%.	46
Tabla 9. Área cromatografica de la señal de interés con adulteraciones en la leche cruda en rangos de 0% a 2,5%.	48
Tabla 10. Pesos de leche cruda y lactosuero de pruebas de reproducibilidad variando su porcentaje de adulteración en rangos de 0% a 15% de la persona N° 1.	49
Tabla 11. Pesos de leche cruda y lactosuero de pruebas de reproducibilidad variando su porcentaje de adulteración en rangos de 0% a 15% de la persona N° 2.	49
Tabla 12. Área cromatografica de la señal de interés de las pruebas de reproducibilidad con adulteraciones en la leche cruda en rangos de 0% a 15% para persona N° 1 y persona N° 2.	51
Tabla 13. Pesos en gramos de las pruebas de repetibilidad.	53
Tabla 14. Área cromatográfica de las pruebas de repetibilidad con 3 horas de adulteración.	54
Tabla 15. Área cromatográfica de las pruebas de repetibilidad con 8 horas de adulteración.	55
Tabla 16. Costos de reactivos.	61
Tabla 17. Costos de insumos.	62
Tabla 18. Costos totales.	64
Tabla 19. Costos totales implementación en la empresa.	65
Tabla 20. Análisis costo beneficio.	65

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Diagrama de flujo general de la implementación de la metodología.	25
Figura 2. Cromatógrafo shimadzu HPLC ubicado en el laboratorio de macromoléculas de la Pontifica Universidad Javeriana.	26
Figura 3. Diagrama de flujo de preparación de muestras.	27
Figura 4. Diagrama de flujo de corrida cromatografica.	29
Figura 5. Esquema básico de un cromatógrafo.	30
Figura 6. Cromatograma de leche con adición del 10% (m/m) de lactosuero.	36
Figura 7. 1) Cromatograma de leche con adición del 5% (m/m) de lactosuero extraído del REAL DECRETO 2021/1993, 2) cromatograma de leche con adición del 5% (m/m) de lactosuero.	36
Figura 8. 1) Cromatograma de leche exenta de lactosuero, 2) Cromatograma de leche con adición del 10% (m/m) de lactosuero sin tiempo de adulteración.	37
Figura 9. Cromatogramas de las muestras 1) leche sin adulterar, 2) 2.5% de lactosuero, 3) 5% de lactosuero, 4) 7.5 % de lactosuero, 5) 10% de lactosuero, 6) 12.5% de lactosuero y 7) 15% de lactosuero con un interés de la señal en tiempo de retención de 9,8 minutos.	39
Figura 10. 1) Cromatograma de leche cruda sin adulterar, 2) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero en polvo, 3) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero estándar, 4) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero liofilizado, 5) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero casero. Todas estas adulteraciones al 10% peso a peso.	41
Figura 11. 1) Cromatograma de leche sin adulterar, 2) Cromatograma de menor concentración de cuajo, 3) Cromatograma de la medida estándar de cuajo, 4) Cromatograma de mayor concentración de cuajo. Las adulteraciones al 5%.	44
Figura 12. 1) Cromatograma de leche sin adulterar, 2) Cromatograma de menor concentración de cuajo, 3) Cromatograma de la medida estándar de cuajo, 4) Cromatograma de mayor concentración de cuajo. Las adulteraciones al 10%.	44
Figura 13. Cromatogramas de maduración de leche tomados del primer compartimiento recogidas durante la semana.	45
Figura 14. Cromatogramas de las muestras del límite de detección.	47
Figura 15. Acercamiento de cromatogramas de las muestras del límite de detección en la señal de interés de 10 minutos de retención.	47
Figura 16. Cromatogramas de las muestras 1) leche sin adulterar, 2) 5% de lactosuero, 3) 10% de lactosuero, 4) 15 % de lactosuero con un interés de la señal en tiempo de retención de 10 minutos para la persona N° 1.	50

Figura 17. Cromatogramas de las muestras 1) leche sin adulterar, 2) 5% de lactosuero, 3) 10% de lactosuero, 4) 15 % de lactosuero con un interés de la señal en tiempo de retención de 10 minutos para la persona N° 2.	50
Figura 18. Cromatogramas de las muestras 1) leche cruda sin adulterar, 2) 2.5% de lactosuero, 3) 5% de lactosuero, 4) 7.5 % de lactosuero, 5) 10% de lactosuero, 6) 12.5% de lactosuero y 7) 15% de lactosuero, 8) 20% de lactosuero con interés en la señal de tiempo de retención de 10 minutos, con tiempo de adulteración de 3 horas.	53
Figura 19. Cromatogramas de las muestras 1) leche cruda sin adulterar, 2) 2.5% de lactosuero, 3) 5% de lactosuero, 4) 7.5 % de lactosuero, 5) 10% de lactosuero, 6) 12.5% de lactosuero y 7) 15% de lactosuero, 8) 20% de lactosuero con interés en la señal de tiempo de retención de 10 minutos, con tiempo de adulteración de 8 horas.	54
Figura 20. Muestras de 15% y 20% de adulteración.	55

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Grafica 1. Curva de calibración de las pruebas de límite de detección.	48
Grafica 2. Curva de calibración de las pruebas de reproducibilidad para la persona N° 1.	51
Grafica 3. Curva de calibración de las pruebas de reproducibilidad para la persona N° 2.	52
Grafica 4. Curva de calibración obtenida a partir del promedio del área cromatográfica con respecto al porcentaje de lactosuero con 3 horas de adulteración.	56
Grafica 5. Curva de calibración obtenida a partir del promedio del área cromatográfica con respecto al porcentaje de lactosuero con 8 horas de adulteración.	57

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Cromatograma de duración de tiempo de corrida.	73
Anexo B. Cromatogramas referenciados en la norma ecuatoriana.	74
Anexo C. Cromatograma de muestras sin tiempo de adulteración.	75
Anexo D. Cromatogramas adulteración de muestras 0% 2,5% 5% 7,5% 10% 12,5% y 15%.	76
Anexo E. Cromatogramas de pruebas de obtención de lactosuero.	80
Anexo F. Cromatogramas de Coagulación enzimática, al 5% y 10%.	83
Anexo G. Cromatogramas de maduración de la leche (sábado-viernes).	86
Anexo H. Cromatogramas de límite de detección (0,01%-2,5%).	90
Anexo I. Cromatogramas de reproducibilidad de persona N°1 Y N°2 (0-15%).	94
Anexo J. Cromatogramas de repetibilidad a 3 Y 8 horas de adulteración.	98
Anexo K. Cotizaciones de reactivos e insumos.	106
Anexo L. Cotización columna y pre columna.	109
Anexo M. Certificaciones congreso.	110
Anexo N. Fichas técnicas de reactivos.	113

SIMBOLOGIA

μL	micro litro
C-GMP	glicomacropéptido de caseína
% p/v	porcentaje peso volumen
WPI	aislados de suero
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
cm	centímetros
nm	nanómetros
°C	grados celcius
ml	mililitros
min	minutos
rpm	revoluciones por minuto
μm	micro metros
kg	kilogramos
mg	miligramos
g	gramos
M	molar
Å	armstrong
Da	dalton

% m/m porcentaje masa masa

TCA ácido tricloroacetico

psi libra fuerza por pulgada cuadrada

R² coeficiente de correlación

GLOSARIO

ADULTERANTE: es una sustancia que puede ser añadida intencionalmente a los productos para aumentar las cantidades visibles y reducir los costes de fabricación.

AMINOÁCIDO: son aquellas moléculas que forman parte de las proteínas compuesta por un grupo amino y un grupo carboxilo.

CASEÍNA: es la proteína que se encuentra en mayor cantidad en la leche y en algunos de sus derivados, que contiene grandes cantidades de fosfato.

CROMATOGRAFÍA: es el método físico de separación en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida.

CROMATOGRAMA: es el resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos del Cromatograma corresponden a los componentes de la mezcla separada.

GLICOMACROPÉPTIDO: es un péptido que se escinde de la molécula de k-caseína por la acción de la enzima quimosina.

LACTOSUERO: es un subproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína durante la elaboración del queso.

LECHE: es el producto integral del ordeño total, en condiciones de higiene que da la vaca lechera en un buen estado de salud y alimentación, sin aditivos de ninguna especie.

PRECIPITADO: sustancia sólida suspendida en el líquido de una disolución que se deposita en el fondo del recipiente.

PROTEÍNA: son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos imprescindibles para el crecimiento del organismo y realizan una enorme cantidad de funciones diferentes.

QUIMOSINA: también conocida como rennina es una enzima proteasa que se encuentra en el abomaso (cuarto estómago de las vacas), que se encarga de romper la proteína k-caseína.

SOBRENADANTE: disolución que permanece de forma líquida tras la formación de un precipitado.

TIEMPO DE RETENCIÓN: es el tiempo característico que tarda un analito particular en pasar a través del sistema (desde la columna de entrada hasta el detector) bajo las condiciones fijadas en cromatografía.

RESUMEN

La adulteración de la leche cruda con lactosuero es uno de los principales problemas en la industria láctea. Estudios previos han evidenciado este tipo de adulteración mediante la identificación del glicomacropéptido de caseína por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), como lo son la Norma Europea 213/2001 y El Real Decreto 2021/1993.

Este trabajo se enfoca en identificar la presencia de lactosuero mediante la cuantificación del glicomacropéptido de caseína por HPLC para el control de calidad de leche cruda, con el fin de verificar su posible adulteración en Colombia. Se prepararon muestras de leche cruda agregando lactosuero variando el porcentaje de adulteración. Se inyectó un volumen de 20 μ l en el equipo HPLC usando una columna de exclusión de peso molecular (SEC), con un flujo de 0.9 mL/min empleando una fase móvil de Buffer fosfato. En los cromatogramas obtenidos se observa una señal con tiempo de retención de 10 minutos que presenta incrementos proporcionales en el área cromatográfica a medida que aumenta el porcentaje de adulteración, se realizó una curva de calibración obteniendo un valor de R^2 "0.9943" mostrando proporcionalidad lineal entre la diferencia de áreas y porcentaje de adulteración.

Se reporta por primera vez una metodología con curva de calibración que permite identificar de manera analítica el porcentaje de adulteración empleando la técnica HPLC, para así poder tener un mejor control de calidad en la leche.

PALABRAS CLAVES: lactosuero, glicomacropéptido de caseína, calidad, adulteración, HPLC.

INTRODUCCION

Actualmente, un problema en la industria láctea es la adulteración de la leche con lactosuero alterando las propiedades fisicoquímicas de esta¹. Estas modificaciones no son detectadas con las técnicas analíticas básicas utilizadas en esta industria láctea como son pruebas de pH, crioscopia, entre otras. Esta práctica genera una disminución en la calidad del alimento y a nivel industrial en su procesamiento debido a que el lactosuero contiene la enzima quimosina², que modifica las propiedades de la leche, generando alteraciones en el producto final y además, debido a su manipulación puede conducir a un deterioro en su calidad microbiológica. Se estima también que la alteración del contenido proteico de la leche puede disminuir su estabilidad y presentar problemas durante su paso a través de los equipos de esterilización. Esta problemática afecta directamente a consumidores, proveedores y distribuidores, y trae consecuencias de índole nutricional, económica y legal^{3 4}. Por lo anterior, surge la necesidad de contar con una técnica confiable que permita detectar la adición de lactosuero en la leche cruda. Por medio de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), se ha logrado la cuantificación del glicomacropéptido de caseína (casein-glycomacropéptide) C-GMP, que es un péptido que se origina cuando al adicionar el lactosuero (que contiene quimosina) a la leche cruda, la proteína caseína se rompe en el enlace de los aminoácidos 105-106 dando origen a una molécula soluble, que comprende la región entre los residuos 106 a 169 C-terminal de la proteína^{5 6}.

El sub-sector lácteo es un mercado que se caracteriza por su excelente calidad y la constante innovación tecnológica en producción, creación y mejoramiento continuo, el cual se ha preocupado por obtener una leche con estándares de calidad internacionales desde el mismo momento de la recolección, hasta su llegada al punto de venta⁷. Un problema que se genera en la línea de calidad es establecer el estado de la leche cruda con el fin de determinar su pureza y

¹ ALCAZAR MONTAÑEZ, C.D., ROSAS RAMIREZ, J., JARAMILLO ARANGO, C. J. y PEÑA BETANCOURT, S. D. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. México. Vol. 31, No. 3. 2000; p. 217 - 222.

² RAJAN SHARMA, N. y BIMLESH MANN, Y.S. Chemical and functional properties of glycomacropéptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. India. Vol 93, No. 1. 2013; p. 21 - 43.

³ AGUDELO GOMEZ, D. A. y BEDOYA MEJIA, O. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Antioquia, Colombia. Vol 2, No. 1 (enero- junio 2005); p. 38 - 42.

⁴ SALAMANCA, M. S. y RESTREPO SALAZAR, J.C. Características fisicoquímicas y microbiológicas de la leche cruda para consumo humano. Ministerio de la Protección Social, Decreto 1880 capítulo III, artículo 6 y 7. 2011; p. 4 – 5.

⁵ ALVARADO CARRASCO, C. y GUERRA, M. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. Venezuela. Vol. 23, No. 1. 2010; p 42 – 49.

⁶ EL-SALAM, M. H., EL-SHIBINY, S. y BUCHHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. El Cairo, Egipto. Vol. 6, No. 4. 1996; p 327 – 341.

⁷ AGUDELO GOMEZ, Op. cit.

evidenciar la adulteración de esta⁸. En algunos casos los proveedores que surten esta materia prima a las industrias lácteas aplican esta adulteración dificultando su detección con la neutralización del pH y enmascarándose en los análisis fisicoquímicos habituales que se le realizan a la leche cruda una vez llega a la planta de acopio antes de entrar al proceso de pasteurización, por lo que la industria láctea necesita contar con una técnica para la detección de la adulteración con lactosuero en la leche cruda, debido a que en el país no se cuenta con las normas técnicas ni un protocolo de dicha técnica, por lo que su implementación se convierte en una herramienta valiosa para la industria láctea.

La compañía Productos Naturales de la Sabana S.A. (Alquería), una de las empresas mejor posicionadas en esta industria y la Pontificia Universidad Javeriana quieren ser pioneros en el desarrollo de la misma para poder llevar a cabo estos análisis siempre buscando una mejor calidad en la leche cruda y por ende en los producto que se le ofrece al consumidor final.

⁸ ALCAZAR MONTAÑEZ, Op. cit.

1. GENERALIDADES

La leche se entiende como el producto integral del ordeño total, en condiciones de higiene que da la vaca lechera en un buen estado de salud y alimentación, sin aditivos de ninguna especie. La fracción proteica de la leche contiene un gran número de compuestos biológicamente activos. Además de las proteínas de la leche (caseínas, albumina y globulinas), existen también pequeñas cantidades de otras proteínas y péptidos. Estos péptidos, que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína nativa, pueden ser liberados por hidrólisis enzimática, por ejemplo, durante la digestión gastrointestinal o durante el procesado del alimento. Estos péptidos bioactivos procedentes de proteínas lácteas presentan una actividad moduladora de numerosos procesos metabólicos del organismo (catabolismo y anabolismo). Asimismo, las proteínas del suero lácteo representan una mezcla variada de proteínas secretadas, tales como alfa-lactoalbúmina, alfa-lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, quimosina, C-GMP y una gran cantidad de factores de crecimiento. Estas tienen una serie de efectos biológicos, que van desde un efecto anticancerígeno hasta efectos en la función digestiva⁹.

La caseína hace parte de un grupo de proteínas secretadas en la leche de la mayoría de los mamíferos, es una fosfoproteína producida por cuatro genes que codifican para las caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y κ , las cuales se organizan en forma de micelas o unidades solubles¹⁰. La k-caseína tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales que se separan de la parte acuosa por acción de enzimas como la quimosina, dos fracciones se originan el fragmento para-k caseína, el cual precipita en la elaboración de quesos debido a su hidrofobicidad y el fragmento correspondiente al C-GMP que es soluble. Dentro de las caseínas de la leche, la k-caseína tiene gran influencia en la composición de la leche en relación con su capacidad de coagulación, tasa de formación de la cuajada y vigor del coagulo en la producción de queso para consumo humano. El conocimiento de los factores que definen el nivel de k-caseína en la leche es de relevancia para los productores y procesadores, puesto que la elevación de su contenido puede derivar en un mayor rendimiento del producto para la elaboración de derivados lácteos y, a su vez, en un mayor beneficio económico¹¹.

El lactosuero de quesería es un subproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína durante la elaboración del queso. Contiene principalmente lactosa (4,5 % p/v), proteínas (0,8% p/v), sustancias de importante valor nutritivo, minerales, vitaminas y grasas. Lo que hace que tenga

⁹ BARO, L., JIMENEZ, J., MARTINEZ FERREZ, A. y BOUZA, J. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. España. Vol. 42 No. 3-4. 2001; p. 135 – 145.

¹⁰ GUEVARA GARAY, L. U., CUERTAS CASTAÑO, D. A. y LLANO NARANJO, F. Kappa caseína de la leche: aspectos bioquímicos, moleculares, productivos y nutricionales. Risaralda, Colombia. Vol. 20 No. 1. 2014; p. 29 – 33.

¹¹ *Ibíd.*

características similares a las de la leche cruda y por esta razón es utilizado como un adulterante ya que esto dificulta su detección¹². La composición y tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y la tecnología empleada para la precipitación de la caseína; si en la coagulación de la leche se utilizan enzimas (quimosina, renina) el lactosuero se denomina dulce, que está basado en la coagulación por la acción de la renina a pH superiores 6,5, y si se emplean ácidos orgánicos (ácido cítrico, fórmico, acético, málico) se denomina lactosuero ácido, resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico) para coagular la caseína en la elaboración de quesos frescos¹³. El lactosuero cuenta con una serie de factores que favorecieron su valorización, logrando que se utilice como materia prima de productos de alto valor nutritivo y no sea únicamente un desecho industrial altamente contaminante. Sus posibles usos puede ser la obtención de concentrados de proteína de suero para productos bajos en grasa, derivados proteicos de suero en postres y productos de confitería y obtención de aislados de suero (WPI) entre otros¹⁴.

El C-GMP es un glicomacropéptido C-terminal que se escinde de la molécula de k-caseína por la acción de la quimosina durante la precipitación de las caseínas en el proceso de elaboración del queso. El C-GMP es hidrofílico y se mantiene en suspensión en la fracción del suero mientras que la sección restante (para kappa-caseína) de la k-caseína precipita para formar parte del cuajo. El C-GMP tiene un peso molecular de 8.000 Dalton, es un glicopéptido que forma agregados a pH neutro y contiene un 50-60% de carbohidratos en su composición (galactosa, N-acetil-galactosamina y ácido N- neuramínico). Es rico en aminoácidos de cadena ramificada (ácido glutámico, lisina y alanina)¹⁵, deficiente en metionina y no contiene fenilalanina. El C-GMP ha mostrado capacidad de neutralizar toxinas microbianas, inhibir la adhesión de bacterias cariogénicas o de virus de la gripe. Regula el sistema inmune y promueve el crecimiento de las bifidobacterias (un grupo de bacterias que normalmente viven en los intestinos)¹⁶. Además, regula la circulación sanguínea y tiene acción antihipertensiva y antitrombótica. C-GMP presenta propiedades sobre el sistema digestivo, reduce las secreciones gástricas y la movilidad estomacal. Además, estimula la liberación de colecistoquinina,

¹² PARRA HUERTAS, R. A. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Medellín, Colombia. Vol. 62, No. 1. 2009; p. 4967 – 4982.

¹³ *Ibíd.*

¹⁴ PARZANESE, M. Tecnologías para la industria alimentaria. Procesamiento de lactosuero. Alimentos Argentinos, una elección natural; p. 1 – 9 disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Tecnologia/tecnologia/Ficha_13_Lactosuero.pdf

¹⁵ RAJAN SHARMA, *Op. cit.*

¹⁶ BRUNSER, O. El papel de las bifidobacterias en el funcionamiento del organismo humano. Santiago, Chile. Vol. 40, No. 3 (27, agosto, 2013); p. 303 – 308.

hormona relacionada con la saciedad. El glicomacropéptido contiene ácido siálico que le confiere beneficios sobre el desarrollo cerebral y potencia el aprendizaje¹⁷.

La adulteración es un acto intencional de degradar la calidad; bien sea por una mezcla, sustitución o la eliminación de algunos de sus componentes o cuando se oculten los defectos en la calidad sanitaria o lo etiqueta no corresponda a las especificaciones de su autorización¹⁸.

Algunos alimentos suelen ser adulterados con el fin de obtener un beneficio económico mayor. Los alimentos de la industria láctea en Colombia se encuentran regulados por el decreto 616 de 2006, en el cual se expidió el reglamento técnico que señala los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendia, importe o exporte en el país. Mencionamos algunos de los parámetros del decreto que influirán en la realización del proyecto:

“Artículo 6°. Características físico químicas de la leche cruda para consumo humano directo. La leche cruda para consumo humano directo debe cumplir con las características fisicoquímicas establecidas en el Artículo 16 del Decreto 616 de 2006 y en las normas que lo modifiquen, adicionen o sustituyan. Adicionalmente, debe cumplir con las siguientes características:

- 1. La leche líquida proveniente de animales bovinos debe como mínimo contener 2,9% de proteína.*
- 2. Debe estar libre de adulterantes, neutralizantes y conservantes.*
- 3. Los niveles de sustancias tales como contaminantes químicos (metales pesados, residuos de medicamentos veterinarios, plaguicidas, entre otros) y toxinas, se deben regir por normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del Codex Alimentarius¹⁹”.*

Dentro de las diferentes técnicas que existen para el control de la adulteración esta la cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se le denomina cromatografía líquida de alta presión o cromatografía líquida de alta resolución aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica²⁰. Una columna de exclusión molecular separa dos

¹⁷ RAJAN SHARMA, Op. cit.

¹⁸ RANGEL, A.C., RODRIGUEZ, V.C. y MARTINEZ, N. Determinación de adulterantes en leches crudas acopiadas en procesadoras de quesos en Montería. Córdoba, Colombia. Vol. 17, No. 2 (27, noviembre, 2013); p. 202 – 206.

¹⁹ SALAMANCA, Op. cit.

²⁰ AGUILAR, M. HPLC of peptides and proteins methods and protocols. Australia. Humana Press, 2004. p. 3 – 4.

componentes a partir de su tamaño, las dimensiones varía dependiendo del volumen de la muestra, es importante señalar que el tamaño molecular real no son siempre iguales cuando se comparan diferentes compuestos, uno puede tener una estructura menos densa, mientras que otros tienen una estructura más densa, por lo que tienen diferentes tamaños moleculares así tengan los mismos pesos moleculares²¹.

Actualmente se cuentan con referentes internacionales, normativas y publicaciones en los cuales se permite detectar la adulteración de la leche líquida y en polvo con suero de quesería en los que se usa la técnica HPLC como el diario oficial de las comunidades europeas en el anexo XVIII²² y en la norma técnica ecuatoriana para la detección de lactosuero por HPLC²³, y el real decreto 2021/1993 de 19 de noviembre, por el que se aprueba un método oficial de análisis de leche y productos lácteos, en España ²⁴, entre otros referentes.

Aparte de la técnica HPLC se disponen de otros métodos también utilizados para la detección del C-GMP entre los cuales está la electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), el cual se ha utilizado ampliamente para separar proteínas nativas y desnaturalizadas²⁵ ²⁶. En algunos países esta técnica ha sido útil para detectar adulteración de leche con lactosuero; el método colorimétrico, en el cual por medio de precipitación de proteínas se busca una relación de ácido sialico con ácido tiobarbiturico²⁷, la electroforesis capilar ha demostrado ser una técnica útil en el análisis de proteínas, péptidos y glicofomas, en el cual pequeñas cantidades de líquido se inyectan en un canal de separación mediante el uso de tampón de inyección, las sustancias se separan con base a su movilidad electroforética la cual es proporcional al tamaño en el interior del tubo²⁸. De todas las técnicas mencionadas se seleccionó HPLC porque

²¹ *Ibíd.* p. 63 – 64.

²² Norma Oficial. Investigación del suero de leche en polvo en la leche desnatada al almacenamiento público mediante determinación de los glicomacropéptidos por cromatografía líquida de alto rendimiento. Vol. 1, No. 1. 2001; p. 63 - 68.

²³ TRIANA, L. Determinación de suero de quesería en la leche fluida y en polvo. Método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Norma Técnica Ecuatoriana. NTE 2401. 2008. P. 1 – 12.

²⁴ Real Decreto. Método oficial de análisis de leche y productos lácteos. España. (3, enero, 1994); p. 62 – 64.

²⁵ GALINDO AMAYA, L. M., COLMENARES, E. V. y VILLAROEL, E.R. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. Maracaibo, Venezuela. Vol. 16, No. 3. 2006; p. 308 – 314.

²⁶ URBAN, G., PEREZ, N., VEGA, S., FRESAN, C., PEREZ, J., PRADO, G., GONZALEZ, M., GONZALES, C. y RAMIREZ, A. Separación por electroforesis (PAGE-SDS) del caseinomacropéptido liberado por quimosina sobre la k-caseína. Efecto de proteólisis por bacterias psicrótrofas. México D.F. Vol. 26, No. 2. 1998; p. 110 – 120.

²⁷ RAJAN SHARMA, *Op. cit.*

²⁸ ISIDRA RECIO, M. R., GARCIA RISCO, R. L. y AGUSTIN OLANO, M. R. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. Madrid, España. Vol. 10, No. 5. 2000; p. 333 – 338.

su tiempo de corrida es menor comparada con una electroforesis, por la exactitud y valores cuantitativos en los resultados obtenidos^{29 30}.

²⁹ MIRALLES BURAGLIA, B. Detección de caseinato y suero en leche y productos lácteos mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectroscópicas. Madrid, España. 2001; p. 1 – 231.

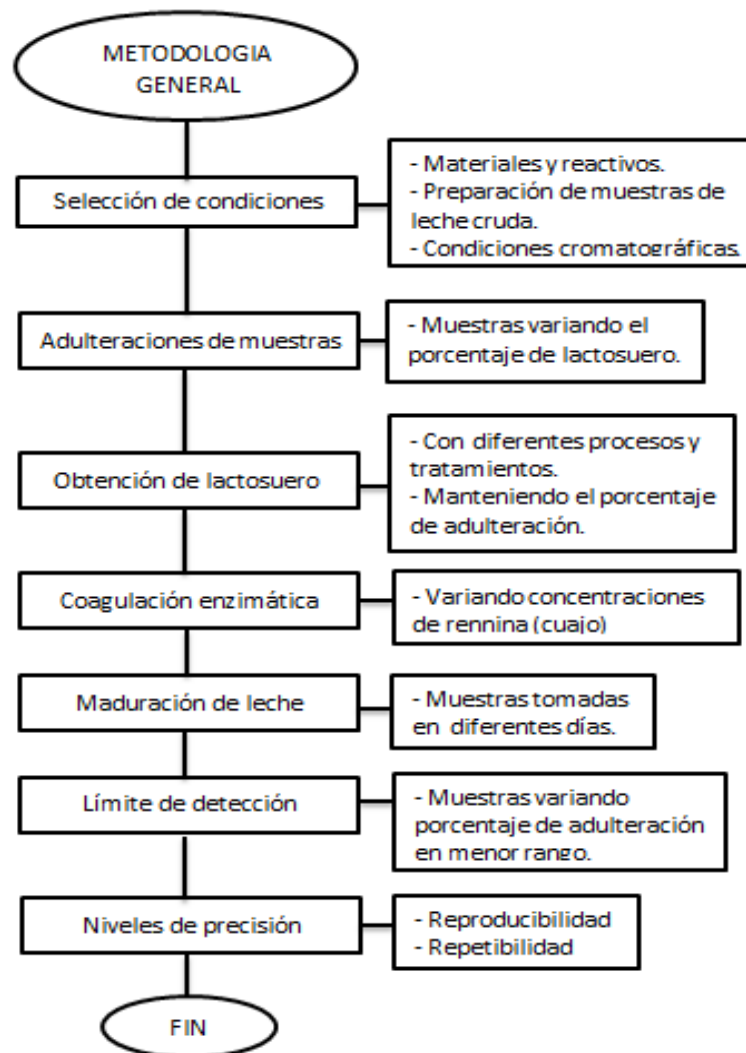
³⁰ RAMIREZ AYALA, A., VEGA Y LEON, S., PRADO FLOREZ, G. Y GUTIEREZ, R. Aplicación de tres métodos analíticos para la detección de suero de quesería en leche UHT comercializada en la ciudad de Mexico. Venezuela. Vol. 34, No. 6. (junio, 2009); p. 406 – 412.

2. IMPLEMENTACION DE LA METODOLOGIA

Existen diversos antecedentes para realizar la cuantificación del C-GMP por HPLC, se seleccionó una técnica en la cual se especificó una metodología de replicar encontrada en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas Anexo XVIII, “*La investigación del suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante determinación de los glicomacropéptidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP)*”.

A continuación se presenta en diagrama de flujo general para la implementación de la metodología:

Figura 1. Diagrama de flujo general de la implementación de la metodología.



2.1 SELECCIÓN DE CONDICIONES

2.1.1 Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia. Equipo HPLC SHIMADZU el cual está comprendido por bomba, inyector automático, una columna KW-802.5, de longitud 30 cm, horno de columna con termostato regulador, detector por luz ultravioleta de onda variable, que permita efectuar mediciones a 205 nm con una sensibilidad de 0,008 Λ y un integrador.

Figura 2. Cromatógrafo shimadzu HPLC ubicado en el laboratorio de macromoléculas de la Pontifica Universidad Javeriana.



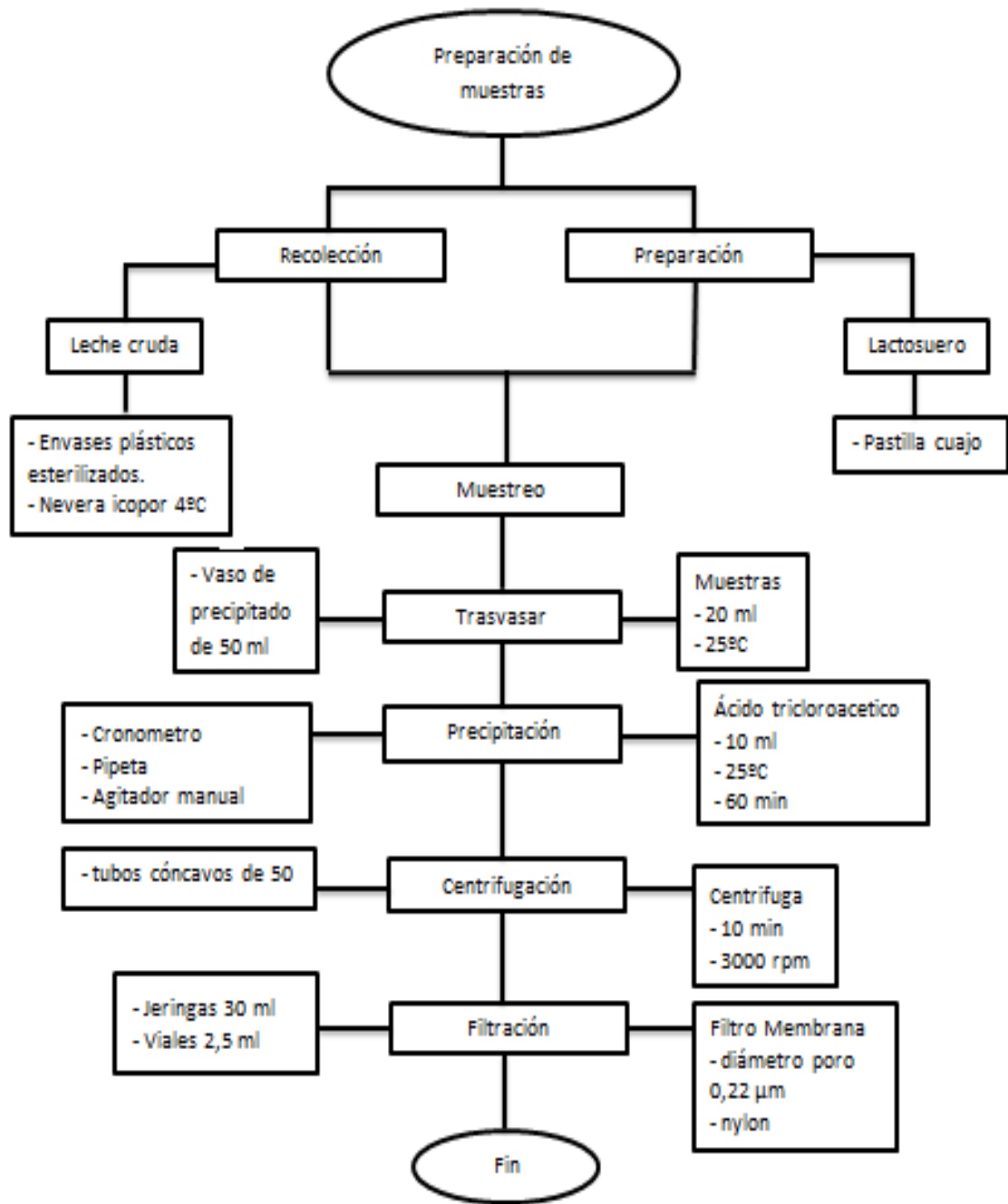
2.1.2 Reactivos.

Tabla 1. Reactivos y grado de calidad.

Reactivo	Grado de calidad
Ácido tricloroacético	PA-ACS
Agua tipo I	PA-ACS
Fosfato di-potásico	PA
Fosfato mono-potásico	PA
Sulfato de sodio	PA
Acido orto fosfórico	PA
hidróxido de potasio	PA

2.1.3 Preparación de las muestras leche cruda. Se evidencia en el diagrama de flujo de la preparación de las muestras desde el momento de recolección de la leche cruda en la planta de acopio hasta tener la muestra lista para la corrida.

Figura 3. Diagrama de flujo de preparación de muestras.



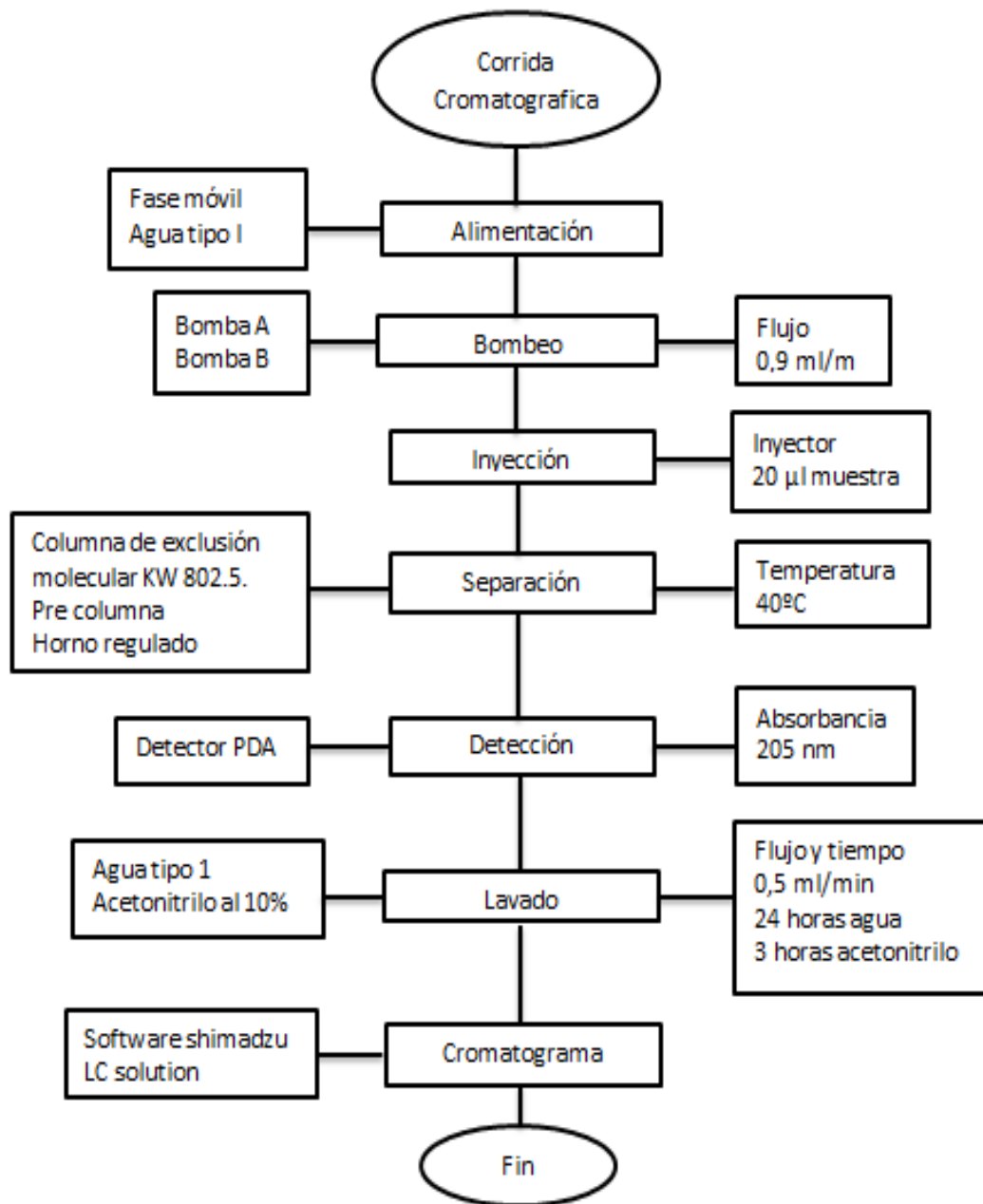
2.1.3.1 Lactosuero. A partir de 10 litros de leche se obtiene una cantidad de 1 a 2 kg de queso y de 8 a 9 kg de lactosuero³¹, el fabricante especifica que una pastilla de cuajo que pesa 0,56 g se usa para 50 L de leche por lo que para su preparación se le agregan 1,12 mg de cuajo comercial a un litro de leche cruda a una temperatura de 36 °C y se deja en reposo por un tiempo de 30 min, luego se separa el precipitado del sobrenadante, se filtra al vacío y por centrifugación para separar los residuos sobrantes, se recolecta el sobrenadante (lactosuero) y se almacena a una temperatura de 4°C, hasta su uso.

2.1.3.2 Preparación de los patrones a partir de leche cruda. Las muestras recolectas para cada ensayo fueron transportadas en refrigeración a una temperatura de 4 °C, homogenizar bien las muestras y trasvasar 20 ml a un vaso de precipitado de 50 ml, a temperatura ambiente, luego añadir en un tiempo de 2 min una cantidad de 10 ml de la solución de ácido tricloroacético (disolver 240 g de ácido tricloroacético en agua para HPLC y completar hasta 1000 ml), con una concentración 2 M, agitando constantemente y mantener a una temperatura de 25°C durante un tiempo de 60 min. Centrifugar por un tiempo de 10 minutos a una velocidad de 3000 rpm y con ayuda de una jeringa de 30 ml recolectar el sobrenadante para pasar por un filtro de membrana de diámetro de poro 0.22 µm y recolectar 2 ml del sobrenadante en un vial de HPLC.

³¹ PARRA HUERTAS Op. cit.

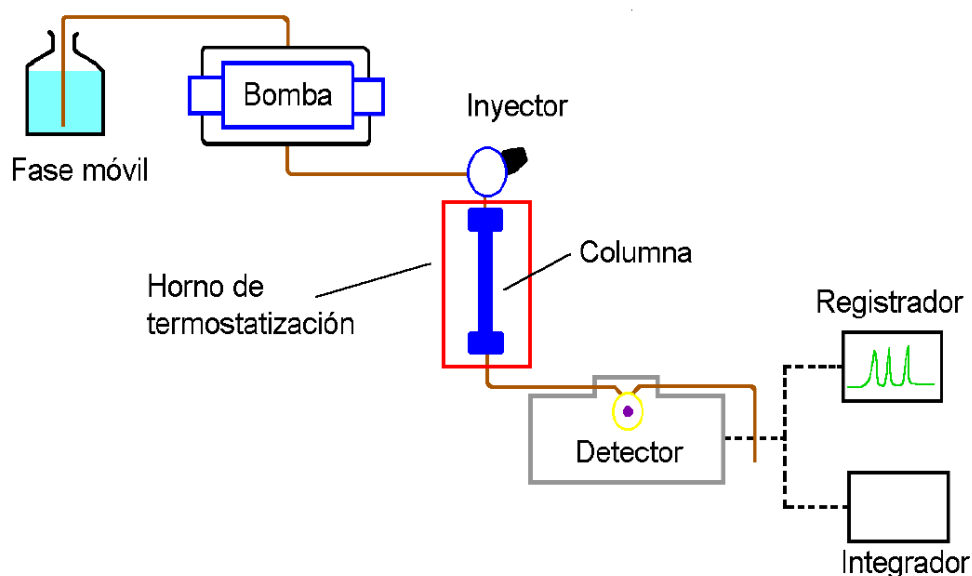
2.1.4 Condiciones cromatográficas.

Figura 4. Diagrama de flujo de corrida cromatografica



Las condiciones cromatográficas que se muestra fueron optimizadas a partir de la inyección de estándares de leche cruda adulterada con lactosuero a diferentes concentraciones en el sistema HPLC.

Figura 5. Esquema básico de un cromatógrafo.



2.1.4.1 Columna. Al no contar con la misma columna TSK 2000 SW (30 cm de longitud, diámetro interno de 0.75 cm) definida, se buscó una columna equivalente la KW 802.5 Shodex (30 cm de longitud, diámetro interno 0.8 cm), columna cromatográfica de exclusión de tamaño a base de sílice, el límite de exclusión para proteínas es de 150.000 Da, el tamaño de poro máximo es de 400 Å.

2.1.4.2 Fase móvil. La composición de la fase móvil que se trabajó fue un buffer compuesto de 1,74 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 21,41 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) disolver en 700 ml de agua para HPLC aproximadamente. Ajustar, si es necesario, a pH 6,0 con ayuda de una solución de ácido fosfórico o de hidróxido de potasio, con concentración de 0,1 M con la ayuda de un balón aforado se lleva hasta 1000 ml con agua para HPLC y homogenizar. Se filtra la solución sobre un filtro de membrana de 0,2 μm de diámetro de poro.

2.1.4.3 Ácido Tricloroacético. Disolver 240g de ácido tricloroacético en agua para HPLC y completar hasta 1000ml. Concentración de 2 M.

2.1.4.4 Detector. Detector por luz ultravioleta de longitud de onda variable, que permita efectuar mediciones a 205 nm de una sensibilidad de 0.008 A. debido a que el C-GMP carece de aminoácidos aromáticos no tiene absorción a 280 nm, se determinó que el C-GPM se detecta solo en la gama de 205 nm a 226 nm³².

³² RAJAN SHARMA, Op. cit.

2.2 ADULTERACIONES DE MUESTRAS

Con las condiciones que se proponen anteriormente se decide realizar las primeras pruebas para observar el comportamiento de la leche cruda libre de adulterante con respecto a las otras muestras variando el porcentaje de adulteración con lactosuero.

Se prepararon muestras de leche cruda agregando lactosuero variando el porcentaje de adulteración (2,5% 5% 7,5% 10% 12,5% 15% (m/m) y leche cruda). Se tomaron los porcentajes masa a masa debido a que en la norma oficial de las comunidades europeas en la metodología esta descrito de esta manera para lo cual se pesaron 20 g de muestra y se tomaron 20 ml para realizar la preparación de muestras y la corrida cromatografía ya explicadas anteriormente

2.3 OBTENCIÓN LACTOSUERO

Hay diferentes maneras de obtener el lactosuero dependiendo el tratamiento o proceso que se le aplique. Se quiere determinar cómo se comportan los diferentes lactosueros en la leche cruda en un mismo porcentaje de adulteración. Se preparan las muestras de los diferentes tratamientos y procesos de lactosuero de la siguiente manera:

2.3.1 Lactosuero estándar. Es el lactosuero que ya se describió anteriormente en los parámetros de análisis, se prepara una cantidad de 150 ml de leche lo que le corresponde a un peso de 0,00168 g de la pastilla de cuajo que fueron pesados en una balanza analítica de precisión porque tiene más cifras significativas y el resultado es más exacto.

2.3.2 Lactosuero casero. Es un lactosuero recolectado de una preparación casera en la cual no se tiene estandarizado la proporcionalidad de cuajo y leche cruda es una adición de cuajo relativa.

2.3.3 Lactosuero en polvo. Se pesa 6,45 g de suero en polvo en la balanza analítica, luego se afora en un balón hasta obtener una cantidad de 100 ml de solución, se agita constantemente hasta formar una sola solución y se pone a refrigerar.

2.3.4 Lactosuero liofilizado. Se tomó una muestra del lactosuero estándar, y se pasó por un proceso de liofilización que consiste en deshidratar la muestra someténdola a una rápida congelación y eliminar el hielo mediante un ligero calentamiento al vacío que lo transforma en vapor, la muestra resultante queda en polvo para poder conocer la relación que hay de agua y lactosuero, ya finalmente se agrega la correspondiente agua que estaba en su estado inicial.

En su procedimiento primero se pesó el tubo cóncavo sin muestra con un peso de 13,6351 g, se le agrego 20 ml de lactosuero líquido quedando con un peso de 33,9888 g, la diferencia de peso del tubo cóncavo sin muestra y con muestra fue de 20,3537 g, luego se congelo con nitrógeno líquido y se pudo a liofilizar durante un día completo, luego de haber deshidratado la muestra el peso del tubo cóncavo era de 14,9264 g por lo que la muestra en si pesaba 1,2913 g. Al realizar la conversión de porcentaje de lactosuero en polvo con respecto a los datos obtenidos se obtuvo

$$\% \text{ lactosuero} = \frac{1,2913}{20,3537} * 100 = 6,34\%$$

2.3.5 Preparación de muestras con lactosuero. La preparación de las muestras fueron las siguientes: leche cruda sin adulterar, leche cruda con lactosuero estándar al 5% y 10%, leche cruda con lactosuero casero al 5% y 10%, leche cruda con lactosuero en polvo al 5% y 10% y leche cruda con lactosuero liofilizado al 5% y 10%.

Se prosigue con la respectiva preparación de muestras y corrida cromatográfica.

2.4 COAGULACION ENZIMATICA

Según las pruebas anteriores los lactosueros se comportaban de diferentes maneras por lo que se decidió verificar si la concentración de cuajo afecta o produce alguna variación en la preparación del lactosuero estándar, y por consiguiente en los resultados obtenidos.

2.4.1 Preparación de lactosuero variando concentraciones. Una pastilla de cuajo comercial pesa 0,56 g y alcanza para 50 litros de leche, entonces la concentración de cuajo se determinó de la siguiente manera:

2.4.1.1 Menor concentración. Una pastilla de cuajo para 70 litros de leche, la relación es 0,008 mg de cuajo sobre mililitro de leche, entonces se prepararon 430 ml de leche que equivale a 3,44 mg de cuajo, se pesaron experimentalmente 3,40 miligramos de cuajo en balanza analítica de precisión.

2.4.1.2 Concentración estándar. Una pastilla de cuajo para 50 litros de leche, la relación es 0,011 mg de cuajo sobre ml de leche, entonces se prepararon 430 ml de leche que equivale a 4,816 mg de cuajo, se pesaron experimentalmente 4,85 mg de cuajo en balanza analítica de precisión.

2.4.1.3 Mayor concentración. Una pastilla de cuajo para 30 litros de leche, la relación es 0,019 mg de cuajo sobre ml de leche, entonces se prepararon 430 ml

de leche que equivale a 8,02666 mg de cuajo, se pesaron experimentalmente 8,05 mg de cuajo en balanza analítica de precisión.

Se utiliza la preparación de lactosuero anteriormente descrito para los de menor concentración, la estándar y la de mayor concentración.

2.4.2 Muestras. Se toman las muestras con concentraciones diferentes y porcentajes de lactosuero del 5% y 10%, cada una por duplicado, las muestras de mayor concentración será la relación 1/30, las muestras de concentración estándar 1/50 y las de menor concentración 1/70. Se realiza su respectiva preparación de muestras y corrida cromatográfica

2.5 MADURACION DE LECHE

Se realiza una recolección de muestras por siete días y se analizaron al mismo tiempo para observar el comportamiento a mayor madures de la leche cruda. Desde el día sábado hasta el día viernes.

Se recogieron muestras de leche cruda en envases de plástico, almacenándolos en una nevera para mantener su cadena de frio a una temperatura de 4°C por un tiempo de siete días. Se tomaron de la siguiente manera, el día sábado dos muestras, el día domingo dos muestras, y los días lunes, martes, miércoles, jueves y viernes se recogieron de a tres muestras; de diferentes compartimientos del camión donde se trasporta la leche. Todas las muestras se recogieron en una hora aproximada de 10 de la mañana. Luego el día lunes (10 días después de haber recogido las primeras pruebas del día domingo) se realizó el proceso correspondiente a preparación de muestras y corrida cromatografica de las muestras recogidas durante toda la semana.

2.6 LÍMITE DE DETECCIÓN

Se determinar el límite mínimo de detección a porcentajes menores al 2,5% de adulteración entre los rangos de 0,01% a 2,5%; para poder saber si en porcentajes mínimos de adulteración con lactosuero se puede identificar y observar por medio de una curva de calibración si mantiene su linealidad.

Se toman las siguientes muestras de leche cruda agregando lactosuero variando el porcentaje de adulteración (0,01% 0,1% 0,5% 1% 1,5% 2% 2,5% y leche cruda) los porcentajes expresados m/m, se tomaron como pesos de las muestras 50 g. Finalmente se realiza la preparación de muestras y corrida cromatografica.

2.7 NIVELES DE PRECISIÓN

2.7.1 Reproducibilidad. Se desea reproducir el proceso que se ha venido realizando para observar cómo se comporta la leche con diferentes porcentajes de adulteración, por lo que dos personas totalmente diferentes siguiendo la preparación de muestras y corrida cromatografica realizan su procedimiento por aparte, con el fin de determinar que cualquier persona puede efectuar estos tipos de análisis.

La persona N° 1 toma cuatro muestras variando el porcentaje de lactosuero de la siguiente manera (5%, 10%, 15% y leche cruda) los porcentajes expresados m/m. Se tomaron como pesos de las muestras 50 g. El mismo procedimiento lo realiza la persona N° 2.

Se deja el mismo tiempo de adulteración de las pruebas anteriores, se realiza la preparación de muestras y corrida cromatografica antes ya explicadas.

2.7.2 Repetibilidad. Se analiza una serie de pruebas con repetición para poder tener un análisis estadístico, obtener así un promedio y finalmente realizar una curva de calibración del porcentaje de lactosuero con respecto al área cromatografica a partir de pruebas de leche cruda agregando lactosuero variando el porcentaje de adulteración.

Se prepararon muestras de leche cruda agregando lactosuero variando el porcentaje de adulteración (2,5% 5% 7,5% 10% 12,5% 15% 20% y leche cruda) porcentajes en peso a peso, con repetibilidad de cada prueba de 4 veces, y con tiempo de adulteración de 3 horas y de 8 horas para todas las muestras.

Se prepararon 4 litros de fase móvil para la cantidad de muestras que se van a correr, al igual que 1 litro de TCA para la precipitación de las proteínas. Se tomaron como pesos de las muestras 70 g, Se realiza la preparación de muestras correspondiente, y la corrida cromatografica se deja con un sistema de apagado debido al tiempo de corrida; primero las pruebas de 3 horas y después a las de 8 horas.

3. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA

Se aplicó la técnica analítica de HPLC, basado en el área cromatográfica y el tiempo de retención, para detectar la adición fraudulenta de lactosuero en la leche cruda buscando una estandarización de la misma.

3.1 SELECCIÓN DE CONDICIONES

Se establecieron condiciones como tipo de columna, flujo, inyección, tiempo de corrida y tiempo de adulteración para empezar a realizar las primeras pruebas de adulteración con lactosuero.

3.1.1 Columna. Teniendo en cuenta que la columna shodex SW 802.5 maneja un intervalo de temperatura entre 10°C a 45°C. Se trabaja isobáricamente a 40°C por lo que a una temperatura más alta la fase móvil se vuelve menos viscosa y la presión no supera el límite permitido que es de 720 psi, según las especificaciones del fabricante para su uso. Se puede trabajar a temperatura ambiente pero su poder de resolución es ligeramente menor.

3.1.2 Flujo e inyección. Usando la fase móvil ya descrita se empezó a subir el flujo de a 0,1 ml por minuto hasta llegar a 1 ml por minuto como dice la norma de las comunidades europeas³³, al realizar la primera inyección de 20 µL el equipo muestra un error debido a que supero la presión máxima establecida (720 psi) por lo que se decidió trabajar con un flujo de 0,9 ml por min³⁴.

3.1.3 Tiempo de corrida. Para establecer el tiempo de corrida se tuvo en cuenta que la señal de interés referenciada se encuentra a los 15,5 minutos³⁵ y al observar en la primera corrida programada a una hora, ver figura 6, que después de 35 minutos no aparece otra señal que afecte el siguiente cromatograma, se programó un tiempo de corrida de 35 minutos.

³³ Norma Oficial. Op. cit

³⁴ Ibid

³⁵ Norma Oficial. Op. cit.

Figura 6. Cromatograma de leche con adición del 10% (m/m) de lactosuero.

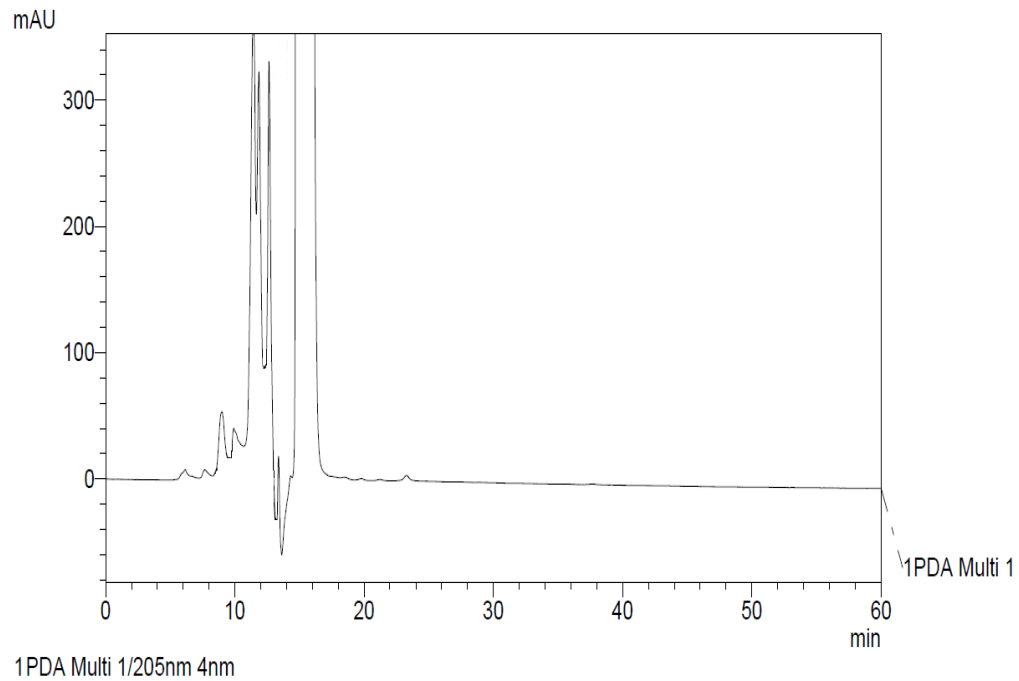
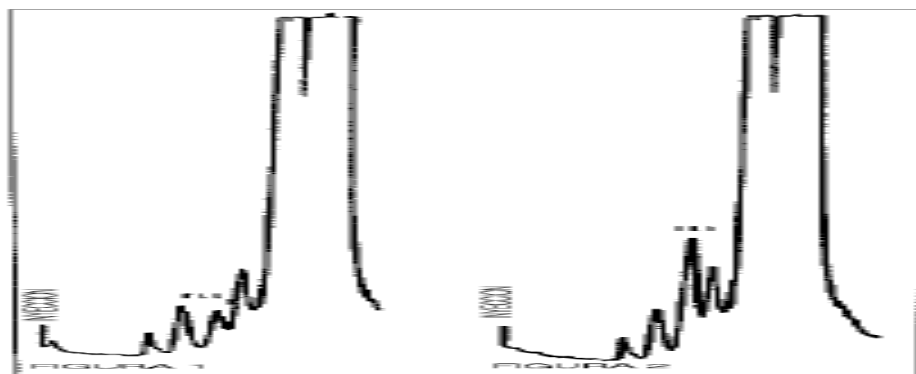
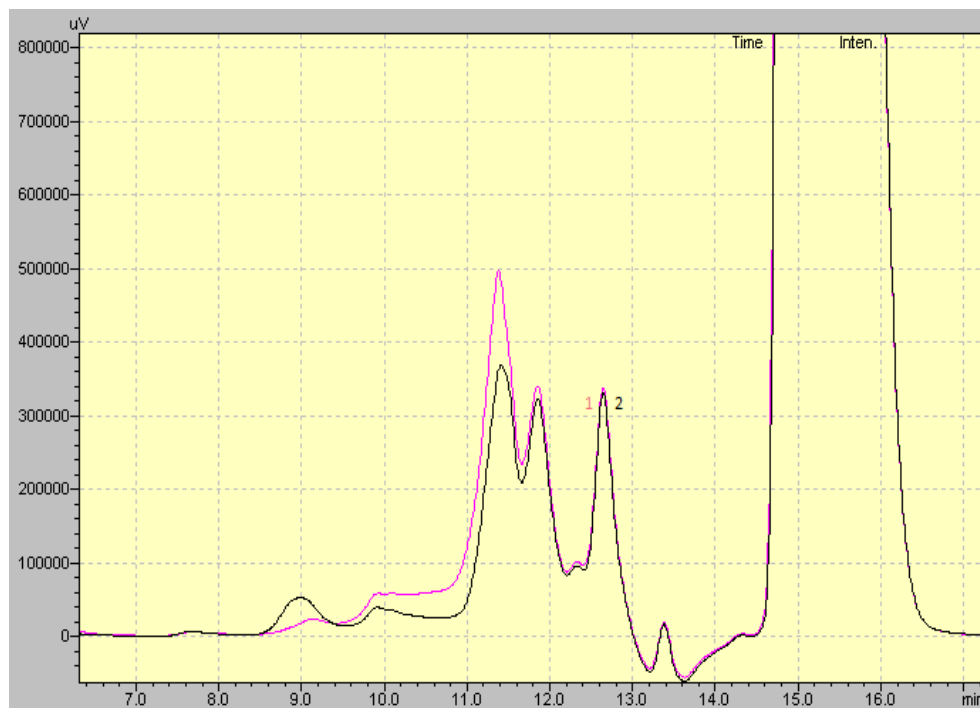


Figura 7. Cromatograma referenciado en norma ecuatoriana.



3.1.4 Tiempo de adulteración. En el primer ensayo se adulteraron las muestras e inmediatamente se les realizó el pre-tratamiento para lo que obtuvimos dos Cromatogramas uno de leche cruda sin adulterar y otro de leche cruda adulterada con lactosuero al 10% (m/m) y no se observa ninguna variación en la señal de interés, ver figura 8, por lo que se resolvió dejar un tiempo límite de adulteración de tres horas debido a que este es el tiempo mínimo que dura el recorrido de la leche cruda entre la finca productora y la planta de acopio.

Figura 8. 1) Cromatograma de leche exenta de lactosuero, 2) Cromatograma de leche con adición del 10% (m/m) de lactosuero sin tiempo de adulteración.



3.2 ADULTERACIONES DE MUESTRAS

Luego de establecer las condiciones de corrida se decide realizar las primeras pruebas en el que se hacen adulteraciones variando el porcentaje de lactosuero de 0% a 15%.

En el procedimiento de la técnica se tomaron para cada muestra 20 g, los pesos de cada muestra se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Pesos de leche cruda y lactosuero a diferentes porcentajes de adulteración.

Porcentaje (%)	Peso leche cruda (g)	Peso lactosuero (g)
0	20	0
2,5	19,5	0,5
5	19	1
7,5	18,5	1,5
10	18	2
12,5	17,5	2,5
15	17	3

Además después de precipitar las proteínas con ácido tricloroacético y esperar los 60 minutos se centrifuga para lo que se tiene que tener en cuenta los pesos para cargar la centrifuga , Colocar los tubos de modo que las cargas que tienen la misma masa o peso queden colocadas de forma opuesta en el rotor, si se tiene un número impar de muestras para ser cargadas, se colocó otra muestra de igual peso a modo de siempre formar pares opuestos de igual peso; nunca colar un número impar de muestras dentro de la centrifuga, utiliza la balanza para estar seguro de la igualdad de los pesos, se calculan los pesos de los tubos de centrifugación porque deben de tener un peso similar con una incertidumbre de $\pm 0,3$ gramos para poder centrifugar de la mejor manera, los pesos de los tubos cóncavos se pueden observar en la tabla 3.

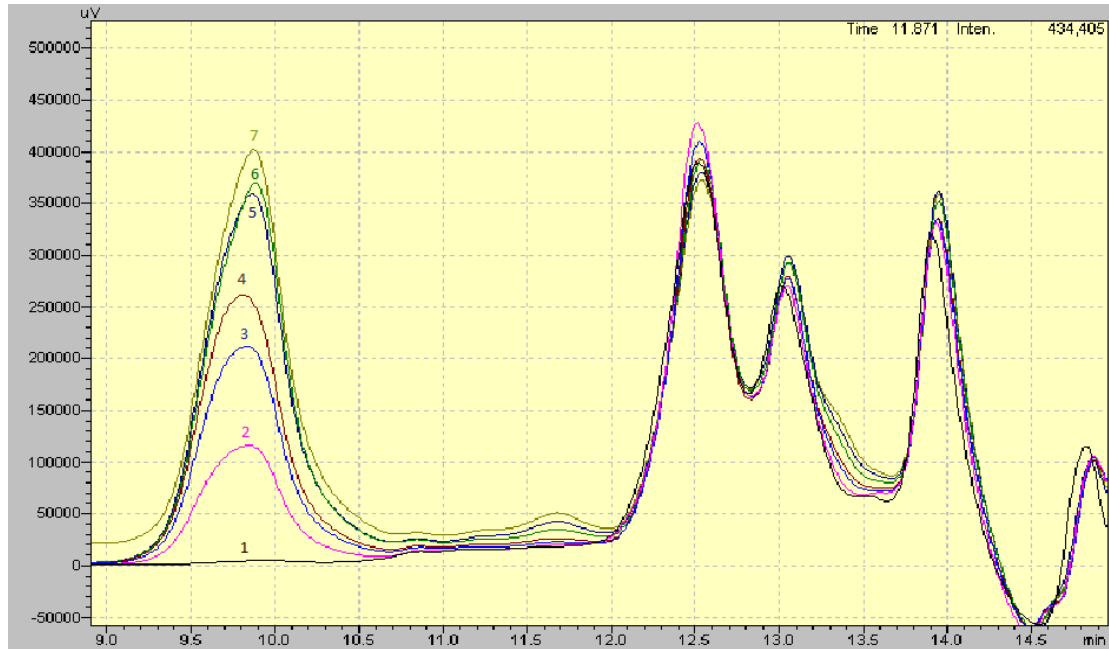
Tabla 3. Corrección de los pesos en tubos cóncavos para una centrifugación más adecuada.

Porcentaje (%)	Peso tubos cóncavos	Corrección de pesos
15	41,06	42,06
12,5	42,16	
10	42,61	
7,5	40,74	42,56
5	41,18	42,43
2,5	42,51	
0	44,69	
Agua	44,60	

Seguir con la centrifugación y filtración descrita en el diagrama de preparación de las muestras de leche cruda, y se hace la corrida cromatografica hasta obtener los cromatogramas.

Al obtener los cromatogramas de las muestras realizadas se pudo evidenciar un incremento proporcional de la señal cromatografica de interés en el tiempo de retención de 9,8 minutos, ver figura 9.

Figura 9. Cromatogramas de las muestras 1) leche sin adulterar, 2) 2.5% de lactosuero, 3) 5% de lactosuero, 4) 7.5 % de lactosuero, 5) 10% de lactosuero, 6) 12.5% de lactosuero y 7) 15% de lactosuero con un interés de la señal en tiempo de retención de 9,8 minutos.



En los cromatogramas obtenidos de las muestras analizadas se ve una similitud con los cromatogramas que tenemos como referentes bibliográficos en los que muestran una tercera señal cuyo tiempo de retención reportado es de $15,5 \pm 1$ minutos con la columna TSK 2000 SW y el flujo de la fase móvil de 1ml/min; al trabajar con una columna homologa (columna de exclusión KW-802.5 Shodex) y con un flujo de fase móvil de 0,9ml/min se obtuvo una señal a los 14 minutos, la cual corresponde a el GMP. Pero adicional al trabajar con estas condiciones encontramos una primera señal con tiempo de retención de 9,8 minutos que no se encuentra reportada pero en la cual se observa una proporcionalidad en el área cromatográfica con respecto al porcentaje de adulteración, por lo que se decidió trabajar en base a esta señal cromatográfica.

3.3 OBTENCION DE LACTOSUERO

Se hizo el correspondiente proceso de preparación de las muestras con los diferentes tratamientos y procesos para la obtención de lactosuero con leche cruda en el que se tomaron como peso de las muestras 50 g, todas estas adulteraciones se hicieron al 10% m/m, los pesos obtenidos de las muestras se pueden observar en la tabla 4.

Tabla 4. Pesos de leche cruda; y de diferentes procesos y tratamientos para la obtención del lactosuero adulterados al 10% peso a peso.

Muestras	Peso leche cruda (g)	Peso lactosuero (g)
Leche cruda	50,04	0
Lactosuero liofilizado	45,07	5,02
Lactosuero líquido	45,03	4,99
Lactosuero en polvo	45,02	5,06
Lactosuero casero	45,04	5,00

Se prosigue con esperar el tiempo de adulteración y la precipitación de las proteínas, luego antes de centrifugar nuevamente se toman los pesos de los tubos cóncavos donde se encuentran las muestras, ver tabla 5.

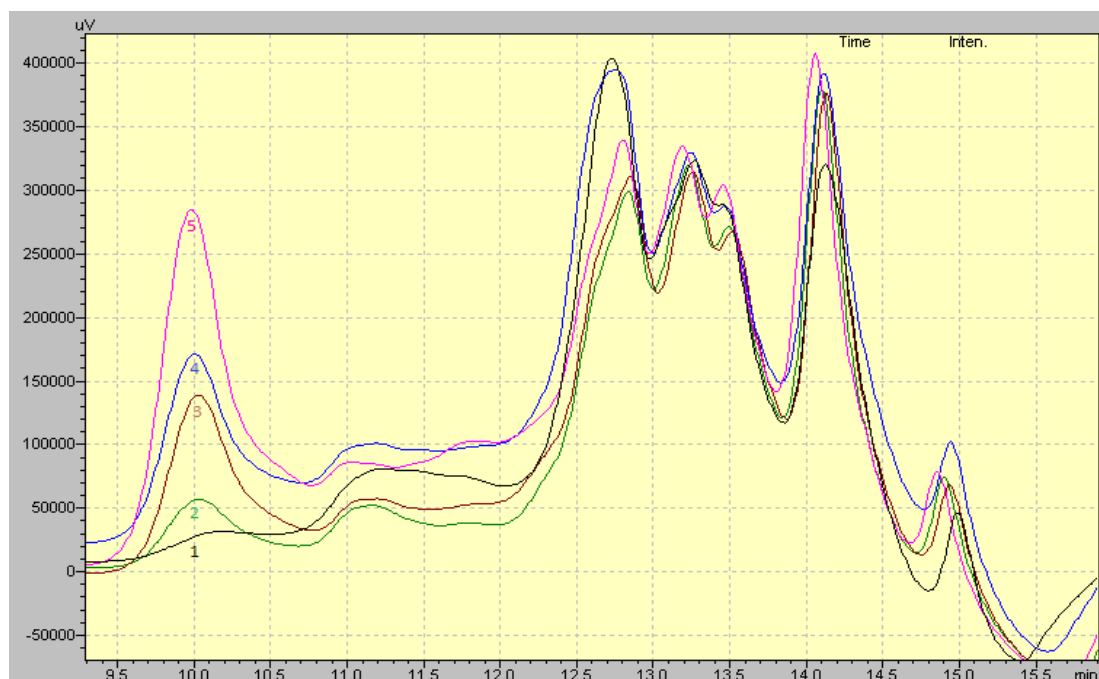
Tabla 5. Corrección de pesos de los diferentes procesos y tratamientos para la obtención de lactosuero para una centrifugación más adecuada.

Muestras	Peso tubos cóncavos (g)	Corrección de pesos (g)
Leche cruda	43,76	43,95
Lactosuero liofilizado	43,96	
Lactosuero estándar	43,86	44,00
Lactosuero en polvo	44,01	
Lactosuero casero	44,27	
Agua	44,26	

Se centrifuga y se filtra descrita en el diagrama de preparación de las muestras de leche cruda. Quedando listo para la corrida cromatográfica.

Los cromatogramas de las muestras con los diferentes tratamientos y procesos para la obtención de lactosuero se pueden evidenciar en la figura 10.

Figura 10. 1) Cromatograma de leche cruda sin adulterar, 2) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero en polvo, 3) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero estándar, 4) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero liofilizado, 5) Cromatograma de leche cruda con adulteración de lactosuero casero. Todas estas adulteraciones al 10% peso a peso.



En la señal de interés la leche cruda sin adulterar es el área con menor proporción con respecto a las demás, en las otras muestras con diferentes adulteraciones se puede identificar que la señal con mayor proporción corresponde a la adulteración casera (el lactosuero que duro mucho más tiempo de haberse preparado), por lo que se puede analizar que el lactosuero con mucho más tiempo genera más cantidad de glicomacropéptido de caseína y ofrece una señal mucho mayor con respecto a las demás. Lo contrario ocurre con la muestra que se adulteró con lactosuero en polvo por lo que la señal es la menor sin contar con la muestra de leche cruda. Para las demás muestras de adulteración con lactosuero liofilizado y estándar dieron muy parecidas y aproximadamente en el promedio de las muestras realizadas.

Hay diferencia en las muestras y en cada uno de los lactosueros porque se comporta de una manera diferente. La señal cromatográfica de interés no se mantiene constante en los diferentes lactosueros a pesar de tener las mismas concentraciones de adulteración con lactosuero, esto es debido tanto a la inactividad de la enzima como a la proteólisis del C-GMP.

3.4 COAGULACION ENZIMATICA

En este ensayo se busca determinar la relación de crecimiento de GMP en la adulteración variando en la concentración de enzima (cuajo) en la preparación del lactosuero. Los pesos de las muestras que se realizaron variando la concentración de cuajo se pueden observar en la tabla 6, aparte la muestra de leche cruda que será el blanco del experimento. Las pruebas se realizaron por duplicado solo para verificar si cada muestra se desarrolló de la mejor manera.

Tabla 6. Pesos de leche cruda y lactosuero variando las concentraciones de rennina (cuajo) por duplicado.

Muestra	Peso leche cruda (g)	Peso de lactosuero (g)
Leche cruda	50,02	0
1/30 – 10% - 1	45,05	5,01
1/30 – 5% - 1	47,50	2,51
1/50 – 10% - 1	44,99	5,01
1/50 – 5% - 1	47,50	2,49
1/70 – 10% - 1	45,04	5,03
1/70 – 5% - 1	47,50	2,49
1/30 – 10% - 2	45,00	4,99
1/30 – 5% - 2	47,51	2,50
1/50 – 10% - 2	45,01	5,00
1/50 – 5% - 2	47,54	2,51
1/70 – 10% - 2	44,99	5,01
1/70 – 5% - 2	47,52	2,51

La corrección de los pesos para las muestras de concentración de cuajo se puede ver en la tabla 7.

Tabla 7. Corrección de pesos de muestras de concentración de rennina (cuajo) variando el porcentaje de adulteración, por duplicado, para Una centrifugación más adecuada.

Muestras	Peso tubos cóncavos (g)	Corrección de pesos (g)
1/30 – 10% - 1	41,76	
1/30 – 5% - 1	43,02	41,71
1/50 – 10% - 1	43,45	42,25
1/50 – 5% - 1	42,29	
1/70 – 10% - 1	43,07	
1/70 – 5% - 1	43,47	43,04
1/30 – 10% - 2	29,78	
1/30 – 5% - 2	26,88	29,85
1/50 – 10% - 2	29,05	
1/50 – 5% - 2	26,99	29,05
1/70 – 10% - 2	29,72	
1/70 – 5% - 2	25,59	29,94
Leche cruda	26,60	
Agua	26,64	

Igual q en las demás pruebas se centrifuga, se filtra y se realiza la corrida cromatografica.

Las muestras realizadas se comportan de diferentes maneras dependiendo de dos factores, primero la concentración del cuajo y segundo el porcentaje de adulteración; las muestras de mayor concentración de cuajo la señal cromatografica aumenta, lo mismo que sucede con el porcentaje de lactosuero, las muestras de 10% siempre fueron mayores a las de 5%, esto se puede evidenciar en la figura 11 y 12.

Con los cromatogramas obtenidos se confrontaron todas las muestras con un porcentaje de lactosuero del 5% comparando la leche cruda que es el blanco con respecto a las tres diferentes concentraciones, ver figura 11. Y se hizo lo mismo con los cromatogramas de las muestras con un porcentaje del 10% comparando la leche cruda con las tres diferentes concentraciones, ver figura 12.

Figura 11. 1) Cromatograma de leche sin adulterar, 2) Cromatograma de menor concentración de cuajo, 3) Cromatograma de la medida estándar de cuajo, 4) Cromatograma de mayor concentración de cuajo. Las adulteraciones al 5%.

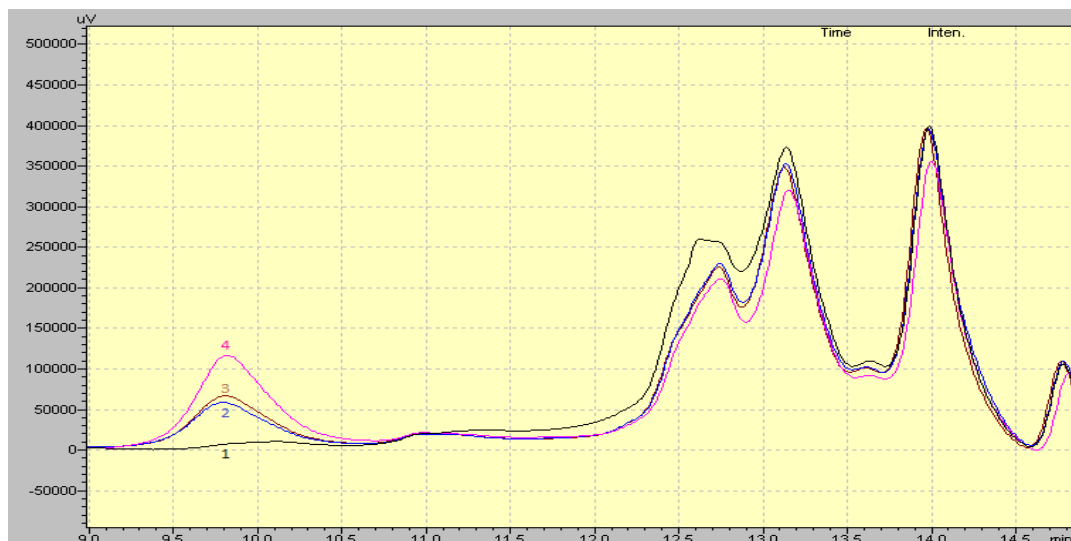
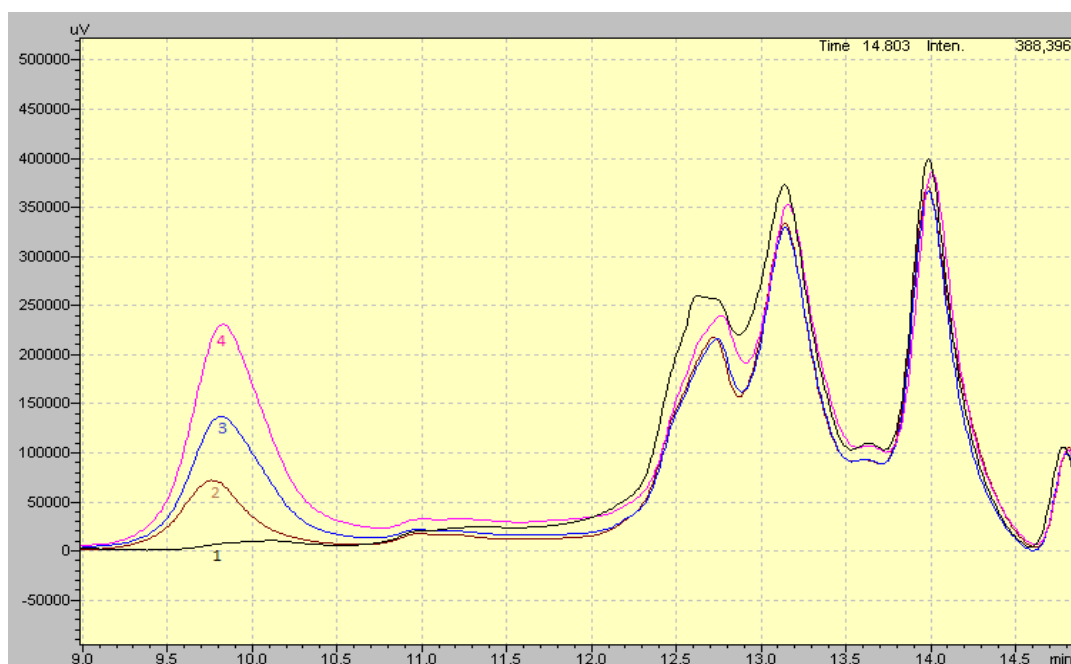


Figura 12. 1) Cromatograma de leche sin adulterar, 2) Cromatograma de menor concentración de cuajo, 3) Cromatograma de la medida estándar de cuajo, 4) Cromatograma de mayor concentración de cuajo. Las adulteraciones al 10%.



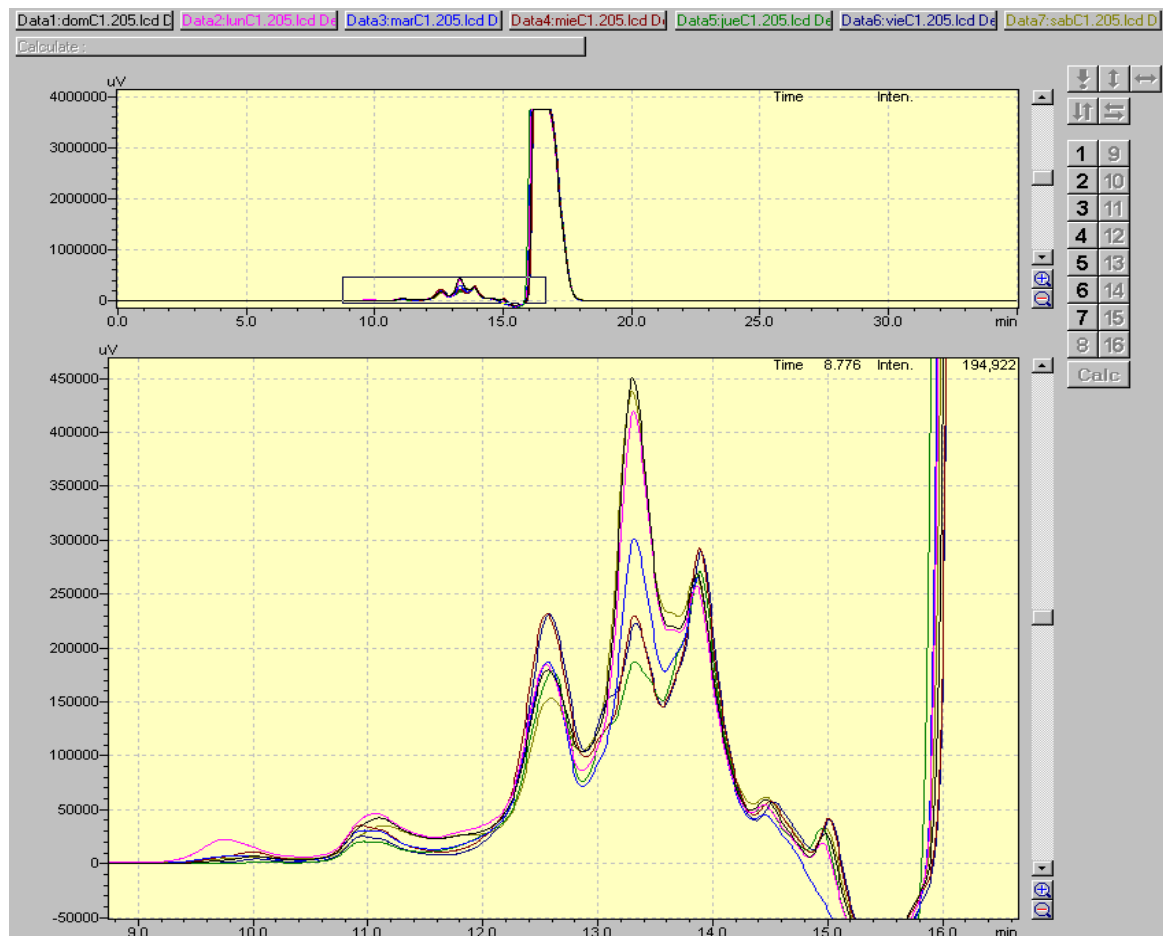
Tanto la concentración de cuajo como el porcentaje de adulteración son importantes para determinar la cantidad de C-GMP. Entre mayor concentración de cuajo se utilice para preparar el lactosuero mayor será la cantidad de C-GMP por lo tanto el área cromatografica va a aumentar debido a que la enzima entra en contacto con la leche va a romper la caseína y general C-GMP.

3.5 MADURACION DE LA LECHE

El principal factor de maduración de la leche es su acidificación, por lo que se buscó una relación entre en pH y el porcentaje de GMP para determinar su afectación.

Se tomaron los cromatogramas del primer compartimiento de las pruebas que se recolectaron durante toda la semana, porque no había una diferencia notable con respecto a los demás compartimientos, ver Figura 13.

Figura 13. Cromatogramas de maduración de la leche tomada del primer compartimiento recogidas durante la semana.



En la señal cromatografica de interés no se observa diferencia significativa dependiendo la madures de la leche, exceptuando la muestra recogida del día lunes del primer compartimiento. Por lo que no se puede afirmar una adulteración en esta muestra debido a que el día lunes normalmente se hacen lavados y cambio de personal, por lo que pudo haber un factor externo que no se puede tener en cuenta.

En general no se observan cambios significativos entre la maduración de la leche y el área cromatografica de la señal de interés en donde está referenciado el glicomacropéptido de caseína.

3.6 LIMITE DE DETECCION

Las muestras que se realizan son muestras con porcentajes desde 0,01% hasta 2,5% de lactosuero para mirar si se comportan de la misma manera que con adulteraciones mayores como se realizó anteriormente.

En la preparación de las muestras se toma los pesos expresados en miligramos debido a que las cantidades para esos porcentajes son pequeñas, por lo que se utiliza una balanza de precisión con varias cifras significativas, ver tabla 8.

Tabla 8. Pesos de leche cruda y lactosuero en las pruebas de límite de detección en rangos de 0% a 2,5%.

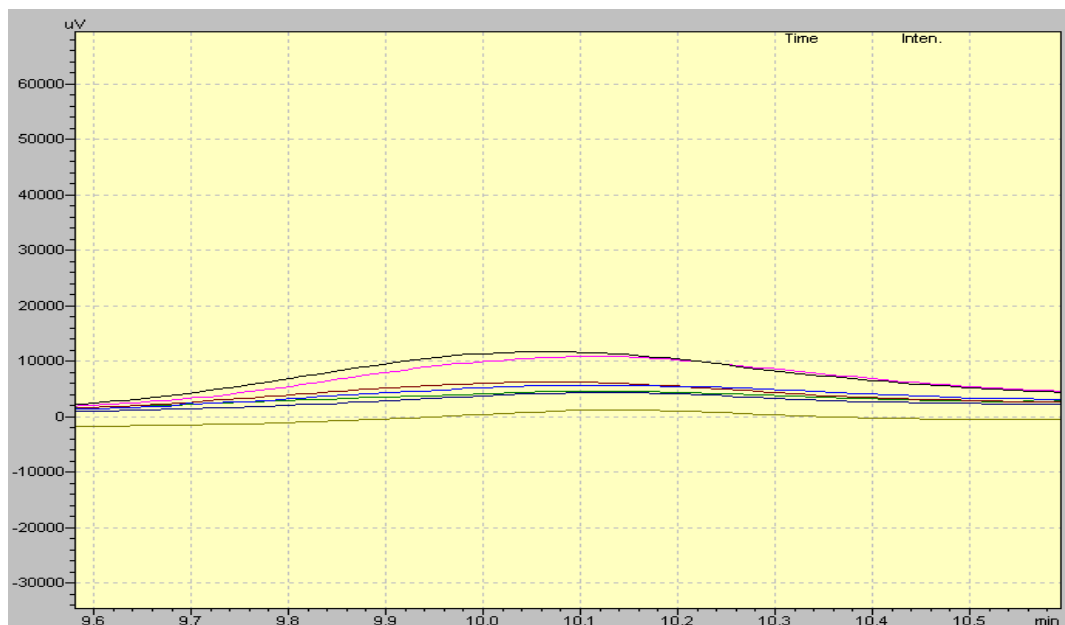
% adulteración	Peso leche cruda (g)	Peso de lactosuero (g)
0	50	0
0,01	49,9944	0,0081
0,1	49,9524	0,0535
0,5	49,7491	0,2513
1	49,5002	0,5001
1,5	49,2493	0,7527
2	49,0016	0,9959
2,5	48,7484	1,2505

Luego de adulterar las muestras se realizó todo el procedimiento correspondiente a preparación de muestras y corrida cromatografica. Se tomaron los cromatogramas de las muestras realizadas y se observa la señal de interés en el tiempo de retención de 10 minutos, en la figura 14 se puede observar los cromatogramas obtenidos de estas pruebas. Como la cantidad de lactosuero en las que se adulteraron las muestras es mínimo, se realizó un acercamiento a la señal de interés que se puede observar en la figura 15.

Figura14. Cromatogramas de las muestras del límite de detección.



Figura 15. Acercamiento de cromatogramas de las muestras del límite de detección en la señal de interés de 10 minutos de retención.



En la figura 15 sobresalen las muestras en las que se adulteró a un 2,5% y 2% con lactosuero a diferencia de las demás muestras que no se observa diferencia significativa. Se toma el área cromatografica para poder realizar una curva de calibración y poder efectuar un mejor análisis de las muestras.

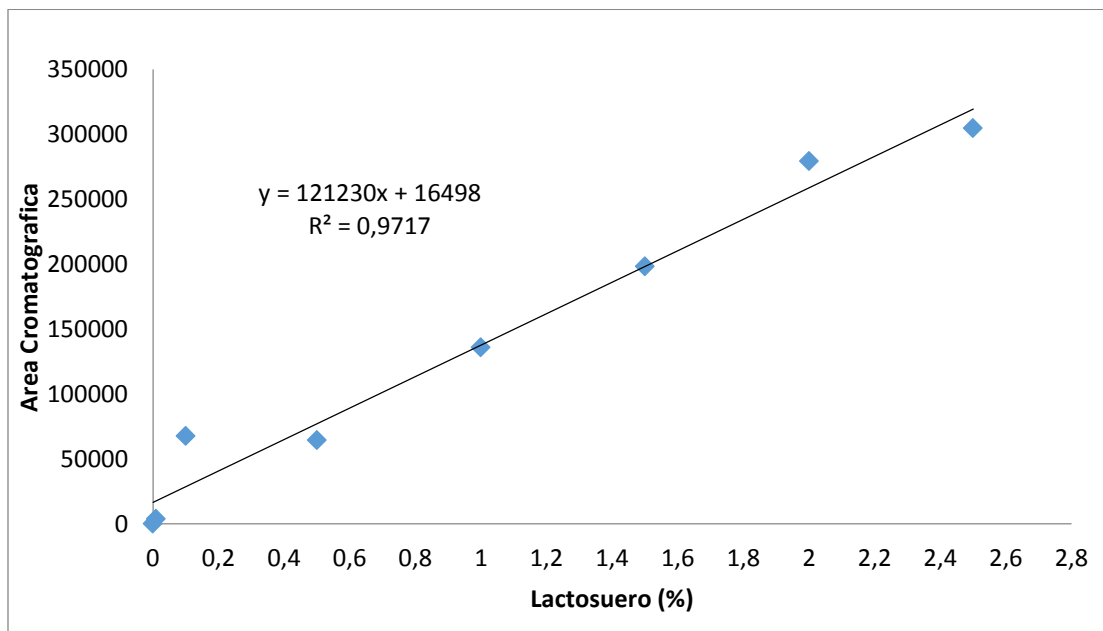
El área cromatográfica de las muestras de límite de detección se pueden observar en la tabla 9.

Tabla 9. Área cromatografica de la señal de interés con adulteraciones en la leche cruda en rangos de 0% a 2,5%.

Muestras	% Lactosuero	Área GMP
1	0	0
2	0,01	3781
3	0,1	67626
4	0,5	64446
5	1	135994
6	1,5	99326
7	2	279467
8	2,5	304887

Con las áreas obtenidas de los cromatogramas se observa una crecimiento proporcional entre el área cromatográfica de la señal obtenida a los 9,8 minutos y el porcentaje de adulteración exceptuando el punto de 1,5% de lactosuero el cual se tomó como un dato anómalo, por lo que no se tienen resultados por triplicado para comparar la respuesta, y se calculó su valor a partir de la ecuación ($y = 121230x + 16498$) generada de la regresión lineal realizada con los otros datos en los que se obtiene un coeficiente de correlación de 0,9717.

Grafica 1. Curva de calibración de las pruebas de límite de detección.



Las muestras evidenciar una linealidad a medida que aumenta el porcentaje de adulteración, y teniendo en cuenta el muestreo anómalo se realizó un ajuste a la recta de este punto y se obtiene un curva de calibración por regresión lineal con un $R^2 = 0,9717$.

3.7 NIVELES DE PRECISION

3.7.1 Reproducibilidad. Dos personas se encargan de realizar muestras por separado desde porcentajes de adulteración de 0% a 15%. Los pesos de las muestras de la persona N° 1 se pueden evidenciar en la tabla 10.

Tabla 10. Pesos de leche cruda y lactosuero de pruebas de reproducibilidad variando su porcentaje de adulteración en rangos de 0% a 15% de la persona N° 1.

% adulteración	Peso leche cruda (g)	Peso de lactosuero (g)
0	50	0
5	46,99	2,49
10	45,01	5,01
15	42,50	7,52

Luego la persona N° 2 realiza el mismo procedimiento de la persona N° 1, los pesos de las muestras se pueden evidenciar en la tabla 11.

Tabla 11. Pesos de leche cruda y lactosuero de pruebas de reproducibilidad variando su porcentaje de adulteración en rangos de 0% a 15% de la persona N° 2.

% adulteración	Peso leche cruda (g)	Peso de lactosuero (g)
0	50	0
5	47,51	2,50
10	45,00	5,02
15	42,51	7,51

Se tomaron los cromatogramas de las dos personas por aparte para poder compararlos y mirar su diferencia entre ellos.

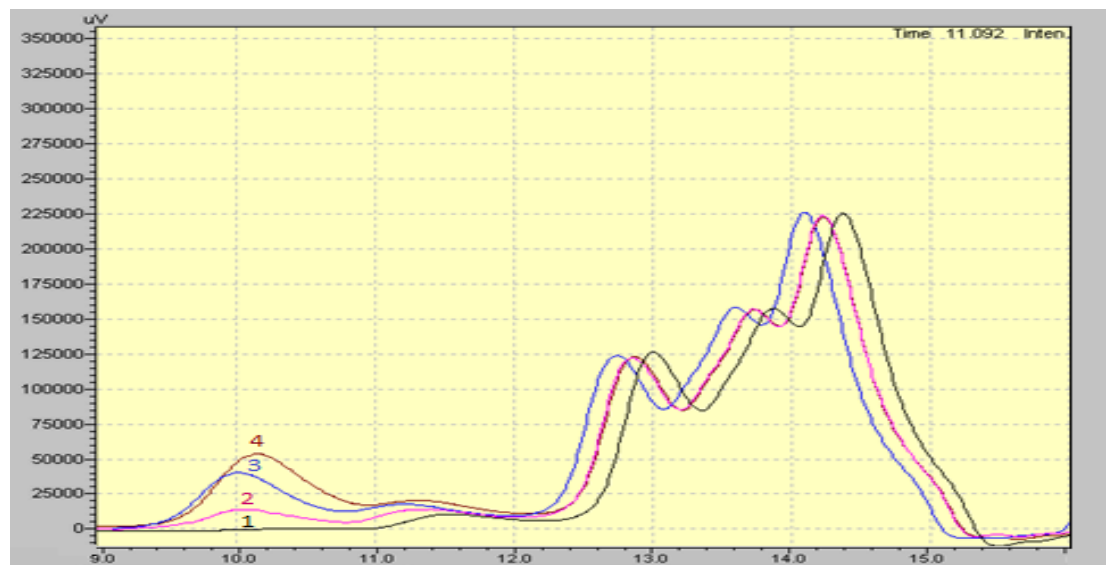
Al igual como se ha venido haciendo antes se analiza la señal de interés en el tiempo de retención de 10 minutos, y además se realiza una curva de calibración para demostrar si presenta linealidad como en las pruebas de repetibilidad anteriormente analizadas.

Los cromatogramas obtenidos para la persona N°1 se pueden observar en la figura 16 y para la persona N°2 en la figura 17.

Figura 16. Cromatogramas de las muestras 1) leche sin adulterar, 2) 5% de lactosuero, 3) 10% de lactosuero, 4) 15 % de lactosuero con un interés de la señal en tiempo de retención de 10 minutos para la persona N° 1.



Figura 17. Cromatogramas de las muestras 1) leche sin adulterar, 2) 5% de lactosuero, 3) 10% de lactosuero, 4) 15 % de lactosuero con un interés de la señal en tiempo de retención de 10 minutos para la persona N° 2.



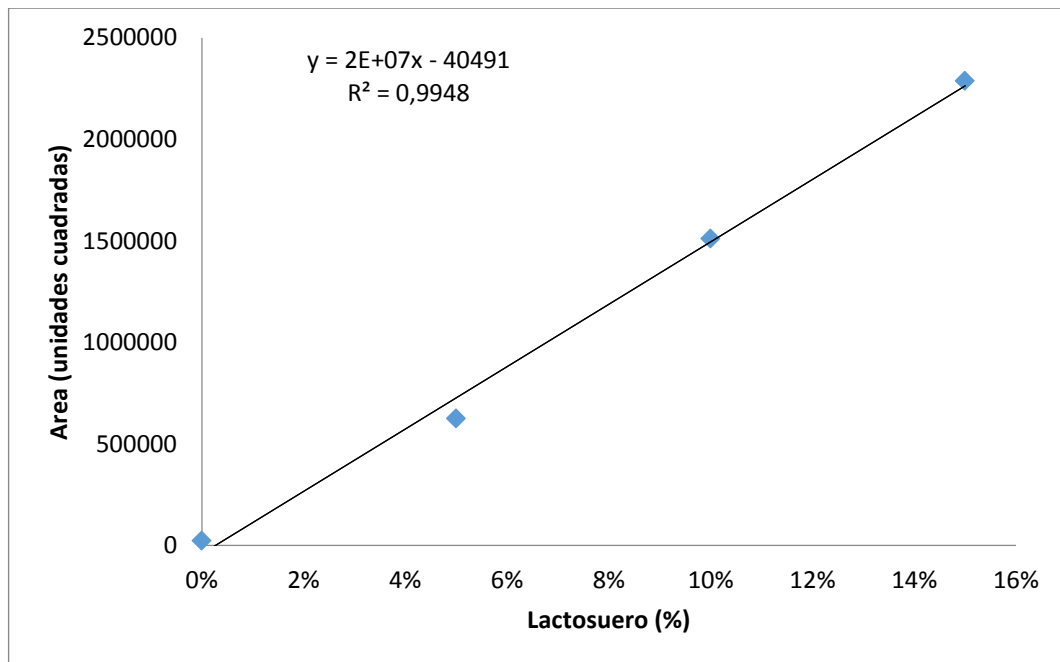
El área cromatográfica de las muestras de reproducibilidad para las dos personas se pueden observar en la tabla 12.

Tabla 12. Área cromatografica de la señal de interés de las pruebas de reproducibilidad con adulteraciones en la leche cruda en rangos de 0% a 15% para persona N° 1 y persona N° 2.

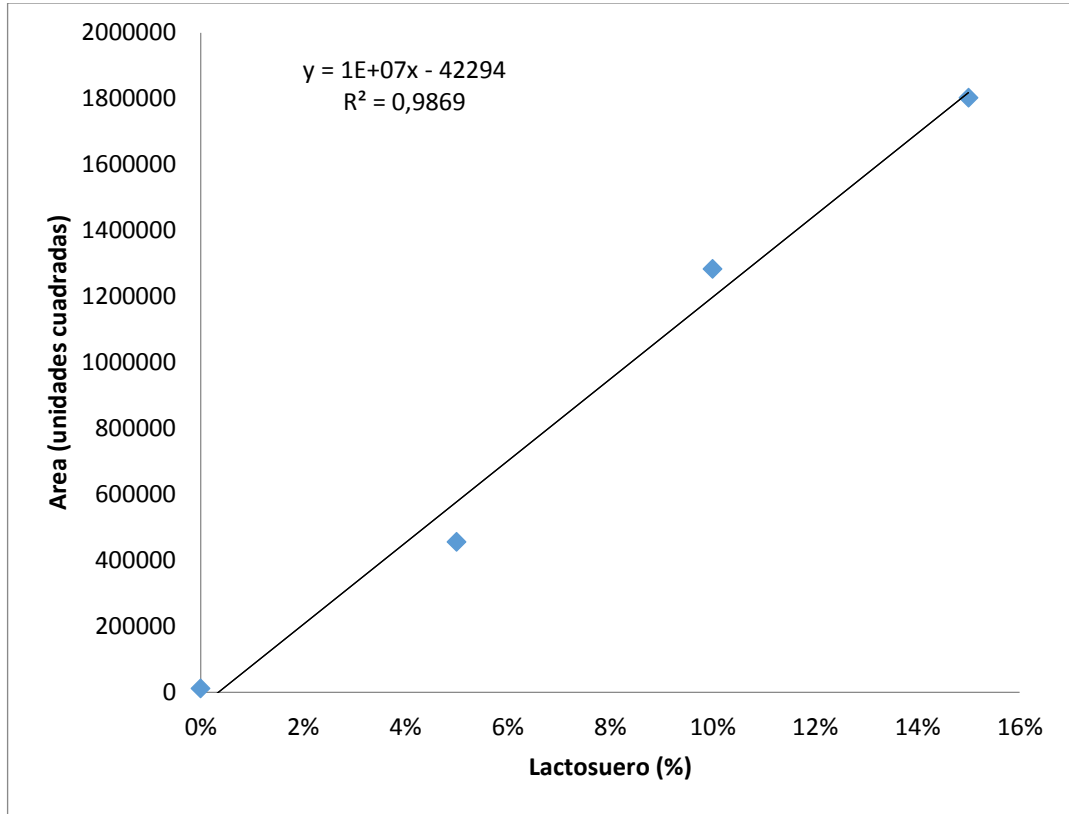
% Lactosuero	Área persona N° 1	Área persona N° 2
0%	22994	11007
5%	624701	455134
10%	1510786	1283205
15%	2287730	1801865

Con las áreas obtenidas de los cromatogramas se procede a realizar la curva de calibración por cada persona. La curva se genera con base a la señal obtenida en el tiempo de retención de 10 minutos, para la persona N° 1 suministrando una ecuación de la recta ($y = 2E+07x - 40491$) con un coeficiente de correlación de 0.9948, ver grafica 2. Y para la persona N° 2 suministrando la ecuación de la recta ($y = 1E+07x - 42294$), con un coeficiente de correlación de 0.9869, ver grafica 3.

Grafica 2. Curva de calibración de las pruebas de reproducibilidad para la persona N° 1.



Grafica 3. Curva de calibración de las pruebas de reproducibilidad para la persona N° 2.



El área cromatográfica de las dos personas son diferentes, las de la persona N° 1 siempre fueron mayores que la persona N° 2, la cual pudo haber sido por varios aspectos, uno de ellos que el tiempo de adulteración no haya sido el mismo o dos que no se agito correctamente luego de haber efectuado las adulteraciones.

A la hora de realizar la curva de calibración con las áreas cromatográficas los dos resultados fueron muy buenos con coeficientes de correlación mayores de 0,99. Verificando así que conserva su linealidad y es proporcional con respecto a los porcentajes de adulteración con lactosuero.

3.7.2 Repetibilidad. Se realiza pruebas por cuadruplicado de porcentajes de adulteración entre rangos de 0% a 20%. Para poder tener un promedio de las áreas cromatográficas con respecto al porcentaje de lactosuero.

Los pesos de las pruebas se pueden evidenciar en la tabla 13.

Tabla 13. Pesos en gramos de las pruebas de repetibilidad.

% adulteración	Pesos (g)							
	1		2		3		4	
	leche	Lacto.	leche	Lacto.	leche	Lacto.	leche	Lacto.
0	70,02	0	70	0	70,02	0	70,02	0
2,5	68,27	1,76	68,25	1,75	68,26	1,76	68,26	1,77
5	66,5	3,57	66,52	3,49	66,52	3,49	66,51	3,49
7,5	64,75	5,25	64,77	5,26	64,75	5,27	64,76	5,27
10	63,02	7,01	63,01	7,01	62,99	7,01	63,01	7,01
12,5	61,26	8,77	61,26	8,76	61,25	8,79	61,24	8,76
15	59,51	10,48	59,5	10,49	59,49	10,51	59,51	10,54
20	56,01	14,01	56	13,99	55,99	14	56	13,99

Al obtener los resultados se tomaron una serie de pruebas de las 4 realizadas cada una con un tiempo adulteración diferente para realizar los cromatogramas, en la figura 18 se puede observar los cromatogramas de 3 horas de adulteración en los rangos de 0% a 20% de lactosuero. Y en la figura 19 los mismos cromatogramas a 8 horas de adulteración.

Figura 18. Cromatogramas de las muestras 1) leche cruda sin adulterar, 2) 2.5% de lactosuero, 3) 5% de lactosuero, 4) 7.5 % de lactosuero, 5) 10% de lactosuero, 6) 12.5% de lactosuero y 7) 15% de lactosuero, 8) 20% de lactosuero con interés en la señal de tiempo de retención de 10 minutos, con tiempo de adulteración de 3 horas.

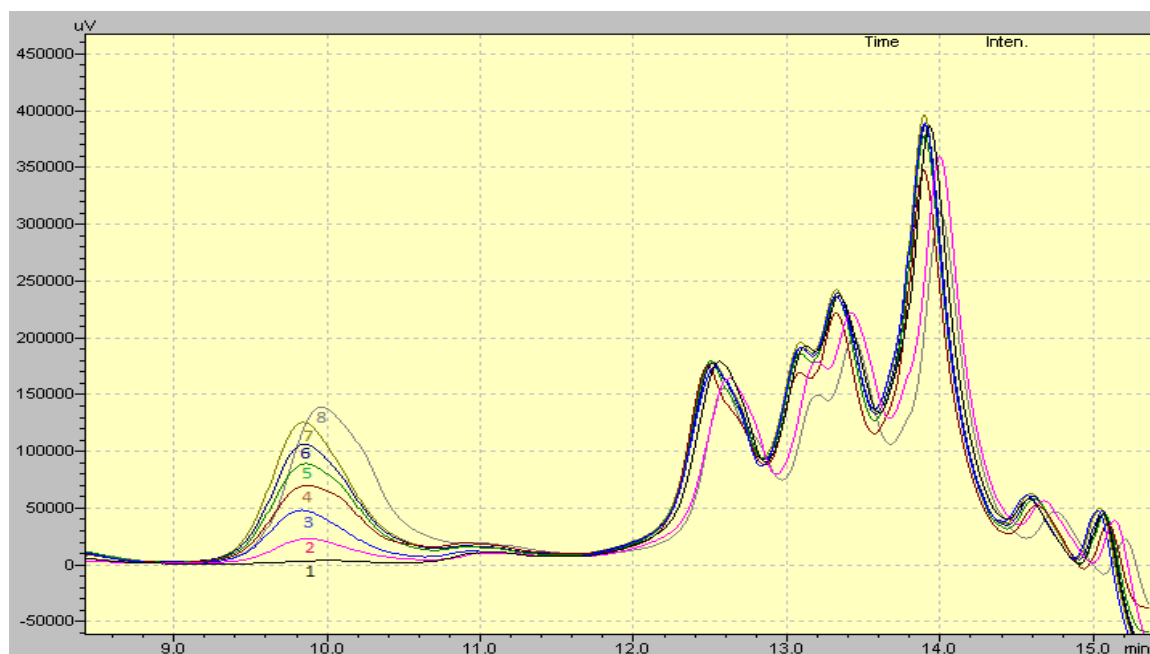
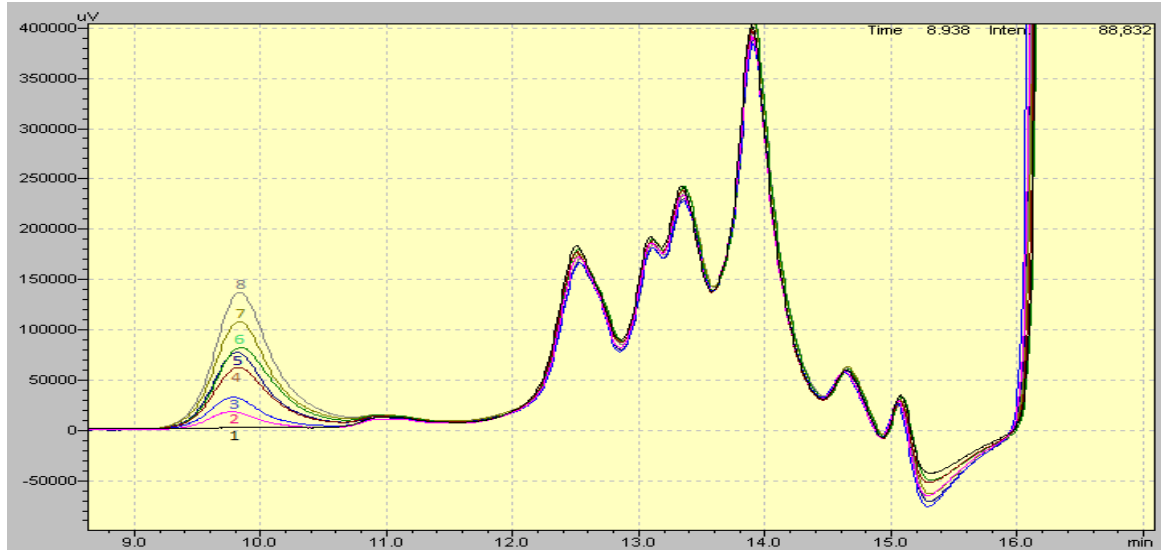


Figura 19. Cromatogramas de las muestras 1) leche cruda sin adulterar, 2) 2.5% de lactosuero, 3) 5% de lactosuero, 4) 7.5 % de lactosuero, 5) 10% de lactosuero, 6) 12.5% de lactosuero y 7) 15% de lactosuero, 8) 20% de lactosuero con interés en la señal de tiempo de retención de 10 minutos, con tiempo de adulteración de 8 horas.



Después de haber obtenido los cromatogramas, se realizó la curva de calibración con el promedio de los datos obtenidos tanto de 3 horas como de 8 horas, en el rango de 0% a 12,5% sin tomar los valores de 15% y 20% ya que no se comportan linealmente aparte de que en estos valores se puede detectar la adulteración a simple vista como se había mencionado anteriormente. El área cromatográfica de las muestras con 3 horas de tiempo de adulteración se pueden observar en la tabla 14 y las de 8 horas de adulteración en la tabla 15.

Tabla 14. Área cromatográfica de las pruebas de repetibilidad con 3 horas de adulteración.

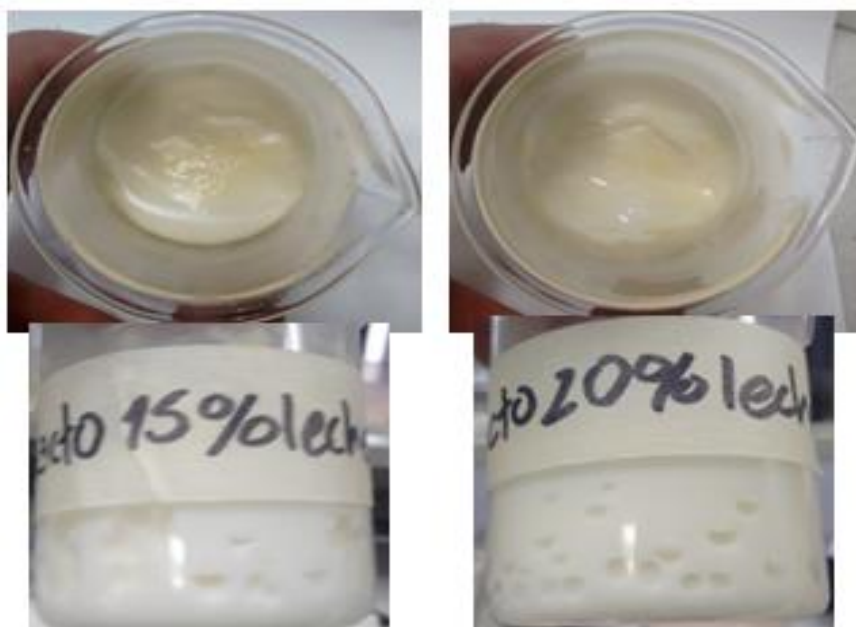
% Lactosuero	3h-1	3h-2	3h-3	3h-4	Promedio	Desviación estándar
0	0	67014	51373	50696	42270	29171
2,5	442098	894645	639336	694046	667531	186099
5	1063808	1308840	1420428	1449147	1310555	175278
7,5	1536970	2325159	2068358	1818028	1937128	337689
10	2714688	2622805	2708409	2660367	2676567	43282
12,5	2759108	3121981	3550755	2679206	3027762	398357
15	4468529	2950677	3761478	2835231	3503978	763769
20	4673529	3892593	4603929	5829664	4749928	801666

Tabla 15. Área cromatográfica de las pruebas de repetibilidad con 8 horas de adulteración.

% Lactosuero	8h-1	8h-2	8h-3	8h-4	Promedio	Desviación estándar
0	19011	72509	69963	65425	56727	25314
2,5	480752	1016838	351155	824470	668303	306389
5	855360	1746723	1383988	1170894	1289241	374400
7,5	1704451	2105908	2186538	1911160	1977014	215361
10	2315193	2255185	2418300	2441923	2357650	87716
12,5	3018744	2880328	2549193	2213194	2665364	360111
15	2960336	2602075	3148652	2622837	2833475	266674
20	3793819	3822881	4075535	2991064	3670824	470501

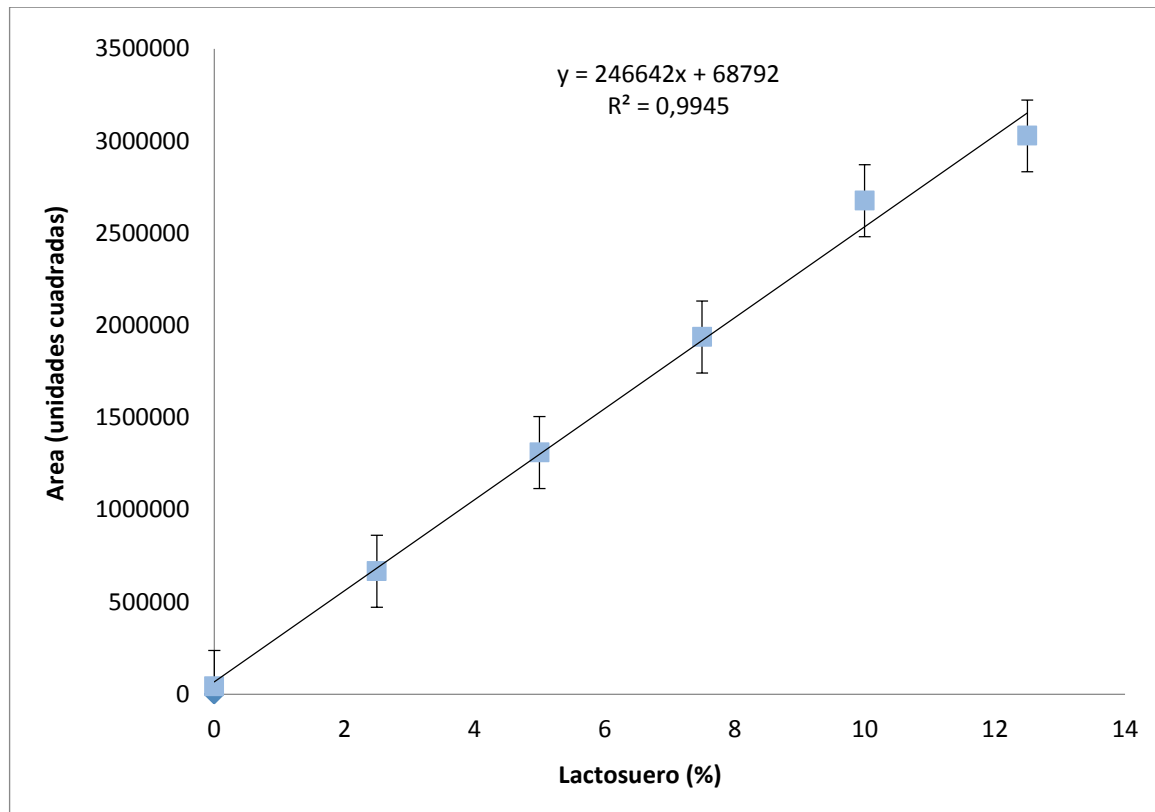
Con respecto a los cromatogramas obtenidos se realizó obtener una curva de calibración para verificar su linealidad tanto para los ensayos a 3 horas de adulteración como para 8 horas. La curva de calibración se genera con base a la señal obtenida en el tiempo de retención de 9.8 minutos que presenta incrementos proporcionales con el área cromatografía a medida que aumenta el porcentaje de lactosuero, se tuvo en cuenta solamente el rango de 0% a 12,5% de adulteración debido a que las muestras de 15% y 20% se observa un deterioro evidente en la leche, ver figura 20.

Figura 20. Muestras de 15% y 20% de adulteración.



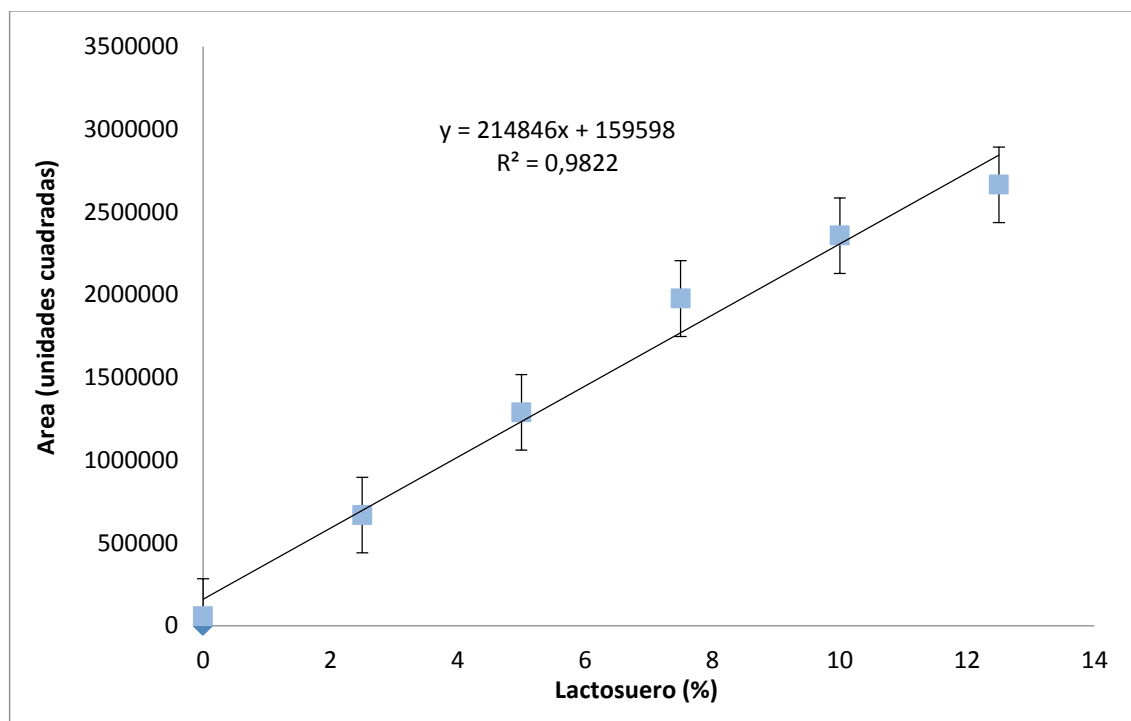
La curva de calibración para 3 horas de adulteración es lineal suministrando una ecuación de la recta ($y = 246642x + 68793$) con un coeficiente de correlación de 0.9945, ver grafica 4.

Grafica 4. Curva de calibración obtenida a partir del promedio del área cromatográfica con respecto al porcentaje de lactosuero con 3 horas de adulteración.




La curva de calibración para 8 horas de adulteración es lineal suministrando una ecuación de la recta ($y = 214846x + 159598$) con un coeficiente de correlación de 0.9822, ver grafica 5.

Grafica 5. Curva de calibración obtenida a partir del promedio del área cromatográfica con respecto al porcentaje de lactosuero con 8 horas de adulteración.



Esto permitió generar una curva de calibración. Se llevaron a cabo dos estudios similares con tiempos de adulteración de 3 y 8 horas, cada punto en la curva es el promedio de un análisis por cuadruplicado. Se obtuvo una linealidad en el rango de 0% a 12.5% de adulteración. Los valores del coeficiente de determinación R^2 para cada grafica indican una aceptable correlación entre las dos variables.

A partir de los resultados obtenidos se genera un protocolo de la técnica en la Pontificia Universidad Javeriana para desarrollar en el departamento de Química en el laboratorio de macromoléculas.

LABORATORIO DE MACROMOLECULAS	PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS	
	PROTOCOLO DE LA TECNICA	2016-10
	DETERMINACION DE LACTOSUERO EN LA LECHE CRUDA POR EL METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)	
<p>1) Objeto: Este método permite determinar adulteraciones con lactosuero en la leche cruda a partir de cromatografía líquida alta eficacia (HPLC).</p> <p>2) Alcance: El método se aplica a cualquier tipo de leche cruda para determinar la adulteración con lactosuero.</p> <p>3) Fundamento del método Se pone en manifiesto la presencia de lactosuero mediante la determinación de glicomacropéptido de caseína por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) previa al pre tratamiento del procedimiento.</p> <p>4) Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balanza analítica - Potenciómetro - Centrifuga - Dispositivo de filtración - Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia que comprende bombas, inyector, columna de exclusión molecular shodex SW 802.5, horno de columna, detector PDA e integrador de valle a valle. <p>5) Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ácido tricloroacético PA-ACS - Agua PA-ACS - Fosfato monopotásico PA - Fosfato dipotásico PA - Sodio sulfato PA <p>6) Preparación de fase móvil: La fase móvil está compuesta por 1,74 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 21,41 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) disueltos en 700 ml de agua para HPLC aproximadamente. Ajustar, si es necesario, a pH 6,0 con ayuda de una solución de ácido fosfórico o de hidróxido de potasio, con concentración de 0,1 M. Completar hasta 1000 ml con agua para HPLC y homogenizar.</p> <p>7) Preparación de ácido tricloroacético: Disolver 240 g de ácido tricloroacético en agua para HPLC y completar hasta 1000 ml. Con una concentración de 2 M.</p>		

8) Procedimiento:

- Recolección de leche cruda, la cual se realizó en la planta de producción de Cajicá en envases de plásticos esterilizados y transportados al laboratorio en una nevera con refrigeración a 4°C para mantener su cadena frío.
- Se adultera la leche cruda con lactosuero en porcentajes peso a peso en una balanza analítica, se toma como peso 50 gramos de muestras, se agitan y se dejan en refrigeración durante tres horas.
- Trasvasar 20 ml de la muestra a un vaso precipitado de 50 ml, llevar a temperatura ambiente.
- Añadir en 2 minutos 10 ml de la solución de ácido tricloroacético empleando una pipeta y agitando constantemente con la ayuda de un agitador, mantener a 25°C durante 60 minutos para precipitación de proteínas.
- Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm para separar el precipitado del sobrenadante.
- Con ayuda de una jeringa de 30 ml recolectar el sobrenadante y pasar por un filtro de membrana de poro 0.22 µm y recolectar 2ml en un vial el sobrenadante.
- Se inyectan 20 µl del sobrenadante de las muestras en un equipo HPLC *Shimadzu Prominence* con un flujo de 0,9 ml/min de la fase móvil, usando una columna de exclusión KW-802.5 *Shodex* a 40°C con un detector PDA que permita efectuar mediciones a 205nm y un tiempo de corrida de 35 minutos.
- Lavar la columna con agua o en toda interrupción superior a veinticuatro horas, a un flujo de 0.5 ml por minuto.
- Obtención de los Cromatogramas y con ayuda del software shimadzu LC solution se obtienen las áreas cromatografías de la señal de interés.

9) Resultados:

Se toma la señal de tiempo de retención de aproximadamente 10 minutos del perfil cromatografico, se obtiene el área bajo la curva con ayuda del programa shimadzu LC solution y finalmente se obtiene una curva de calibración del porcentaje de adulteración con respecto al área cromatografica.

SUPERVISADO POR: RICARDO VERA BRAVO	 <p>Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá</p>	REVISADO POR: ALEJANDRO REYES
ELABORADO POR: ANGELA HERNADEZ STEVEN PENA		APROBADO POR: CRISPIN CELIS

4. COSTOS DE IMPLEMENTACION DE LA PROPUESTA

Los costos que se deben de tener en cuenta para la implementación de la propuesta se dividen en dos partes, la primera es el costos indirectos en donde hace parte valores como reactivos, insumos, agua tipo I, columna y pre columna. Y segundo los costos directos que incluyen gasto en mano de obra de supervisión, mano de obra de operación, mantenimiento y uso de equipos. Todos los costos se realizan a partir de una muestra.

4.1 COSTOS INDIRECTOS

4.1.1 Costos de reactivos. Se tienen en cuentas los reactivos que se utilizan en la preparación de fase móvil y en la precipitación de proteínas.

4.1.1.1 Fase móvil. La preparación para un litro de fase móvil corresponde a 1,74 g de fosfato dipotasico (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato monopotasico (KH_2PO_4) y 21,41 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4). Para una muestra se necesita poner a correr la fase móvil por una hora para estabilizar, además la corrida por cada muestra es de 35 min, con un flujo de 0,9 ml/min.

Aproximadamente se gastan 100 ml de fase móvil para la corrida de una muestra, 60 ml para estabilizar el equipo y 40 ml que se gasta en la corrida que dura 35 min, por lo que las nuevas cantidades que se utilizan para las pruebas corresponde a 0,174 g de fosfato dipotasico (K_2HPO_4), 1,237 g de fosfato monopotasico (KH_2PO_4) y 2,141 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4).

Un kg de K_2HPO_4 vale \$291.160, si se requieren 0,174 g de K_2HPO_4 el costo es de:

$$C_{K_2HPO_4} = \$50,66$$

Un Kg de KH_2PO_4 vale \$145.000, si se requieren 1,237 g de KH_2PO_4 el costo es de:

$$C_{KH_2PO_4} = \$179,36$$

Un kg de Na_2SO_4 vale \$92.800, si se requieren 2,141 g de Na_2SO_4 el costo es de:

$$C_{Na_2SO_4} = \$198,68$$

4.1.1.2 Ácido tricloroacético. Para cada muestra se utilizan 10 ml de TCA, La preparación de ácido tricloroacético es de 240 g para un litro de solución. Se necesitan 2,4 g para 10 ml de solución.

Un kg de TCA vale \$440.452, si se requieren 2,4 g de TCA el costo es de:

$$C_{TCA} = \$1.057,08$$

A continuación se encuentra la tabla de costos de reactivos utilizados en el proceso:

Tabla 16. Costos de reactivos

Reactivo	Cantidad	Precio
Ácido Tricloroacético	2,4 g	\$1.057,08
fosfato dipotasico	0,174 g	\$50,66
fosfato monopotasico	1,237 g	\$179,36
Sodio Sulfato	2,141 g	\$198,68
TOTAL		\$1.485,797

4.1.2 Costos de insumos. Insumos como filtros de membrana, unidades de filtración, tubos cóncavos para centrifuga, jeringas y demás insumos.

4.1.2.1 Membrana millipore en nylon. Membrana millipore en nylon de 0,22 micras de poro y 47 mm de diámetro se necesitan una por cada prueba.

La caja de estas membranas cuestan \$751.687 por 100 unidades, si se requiere una unidad el costo es de:

$$C_{\text{membrana nylon}} = \$7.516,9$$

4.1.2.2 Unidades de filtracion millipore tipo millex. Para las unidades de filtracion millipore, tipo millex se necesita una unidad en el desarrollo de una prueba.

La caja de estas unidades de filtración cuestan \$1.283.610 por 100 unidades, si se requieren una unidad el costo es de:

$$C_{\text{unidad filtracion}} = \$12.836,1$$

4.1.2.3 Tubos cóncavos para centrifuga de 50 ml. Los tubos cóncavos para centrifuga de 50 ml se necesitan una por prueba. La caja de tubos para centrifuga cuestan \$174.928 por 50 unidades, si se requiere una unidad el costo es de:

$$C_{\text{tubos centrifuga}} = \$3.498,6$$

4.1.2.4 Jeringas de 20 ml. Para las jeringas de 20 ml se necesitan una por prueba. La caja de jeringas cuestan \$50.344 por 80 unidades, si se requieren una unidad el costo es de:

$$C_{jeringas} = \$629,3$$

4.1.2.5 Pastilla de cuajo. También se debe tener en cuenta una pastilla de cuajo para la preparación del lactosuero, teniendo un costo de:

$$C_{cuajo} = \$1.000$$

A continuación se encuentra la tabla de insumos utilizado en el proceso:

Tabla 17. Costo insumos.

MATERIALES	Cantidad	Precio
Membrana millipore en nylon 0,22 micras de poro 47mm de diámetro	1 und.	\$7.516,9
Unidades de filtración millipore, tipo millex. Membrana durapore de 0,22 micras, 33 mm de diámetro.	1 und.	\$12.836,1
Tubos cóncavos de 50 ml para centrifuga	1 und.	\$3.498,6
Jeringas de 20 ml	1 und.	\$629,3
Pastilla de cuajo	1 und.	\$1.000
TOTAL		\$25.480,9

4.1.3 Costo agua tipo I. El agua tipo I utilizado para la preparación de fase móvil, ácido tricloroacetico, mantenimiento de columna y para la purga de los materiales utilizados por prueba es aproximadamente 300 ml. Si el litro vale \$80.000, el costo por los 300 ml es de:

$$C_{agua\ tipo\ I} = \$24.000$$

4.1.4 Costos columna y pre columna. La columna de exclusión molecular shodex KW-802.5 tiene un costo de \$3.563.973,9 y una pre-columna con un costo de \$1.430.366,4; tiene una vida útil de 1000 corridas, por lo tanto el costo de la columna y pre columna por corrida es de aproximadamente:

$$C_{columna\ por\ corrida} = \$5.000$$

4.2 COSTOS DIRECTOS

Estos incluyen los siguientes gastos: mano de obra de supervisión, mano de obra de operación, mantenimiento y uso de equipos.

4.2.1 Mano de obra supervisión. La mano de obra de supervisión es de aproximadamente \$3.000.000 mensual, el cual dirige el operario, está pendiente del buen uso y desarrollo del procedimiento. La mano de obra de supervisión por día es aproximadamente de:

$$C_{\text{mano obra supervision}} = \$100.000$$

4.2.2 Mano de obra operación. La mano de obra de operación para un técnico es de aproximadamente \$1.800.000 mensual, en el que se encarga de todo el proceso de pre tratamiento, tratamiento y corrida en el equipo de cromatografía. Un operario se encarga del desarrollo el procedimiento ya mencionado, el valor de mano de obra de operación del funcionario por día es de:

$$C_{\text{mano obra operacion}} = \$60.000$$

4.2.3 Mantenimiento. Los costos de mantenimiento preventivo del equipo de cromatografía líquida de alta eficacia HPLC se realizan cada año por un valor de \$8.000.000, el valor de este mantenimiento por prueba tiene un costo aproximado de:

$$C_{\text{mantenimiento preventivo}} = \$22.000$$

Y los costos de mantenimiento correctivo dependen del tipo de problema que se esté generando, el tiempo aproximado para este tipo de mantenimiento es de cada 5 años por un valor aproximado de \$20.000.000, el valor de este mantenimiento por prueba tiene un costo aproximado de:

$$C_{\text{mantenimiento correctivo}} = \$11.000$$

4.2.4 Uso de equipos. Contando el equipo completo de cromatografía líquida de alta eficacia, centrifuga, baño maría, filtración a vacío, potenciómetro, balanza y demás.

4.2.4.1 HPLC. El equipo de cromatografía líquida de alta eficacia que comprende los reservorios, bomba A y B, automuestreador, horno con termostato, detector PDA, integrador de valle a valle, tiene un valor de \$150.000.000 con una vida útil de 15 años, el valor de este equipo por prueba es de aproximadamente:

$$C_{\text{HPLC por prueba}} = \$28.000$$

4.2.4.2 Centrifuga refrigerada. La centrifuga refrigerada tiene un valor de \$4.500.000 con una vida útil de 5 años, el valor de este equipo por prueba es de:

$$C_{centrifuga\ por\ prueba} = \$2.500$$

4.2.4.3 Otros equipos. Como filtración a vacío, baño ultrasonido, potenciómetro y balanza tiene un valor por prueba aproximadamente de:

$$C_{equipos\ por\ prueba} = \$5.000$$

Tabla 18. Costos totales

Ítem	Costo
Reactivos	\$1.485
Insumos	\$25.480
Agua tipo I	\$24.000
Columna y precolumna	\$5.000
Mano obra	\$160.000
Mantenimiento	\$33.000
uso equipos	\$35.500
TOTAL	\$284.465

El costo total para la implementación de la propuesta contando los reactivos, insumos, agua tipo I columna, precolumna, mano de obra tanto de supervisión como de operación, mantenimiento y uso de equipos es de aproximadamente \$284.500 por muestra.

4.2.5 Implementación de la propuesta en la empresa. Si la empresa Productos Naturales de la Sabana desea implementar la compra del equipo de cromatografía líquida de alta eficacia, para el desarrollo de estas pruebas en la empresa, la compra de reactivos, insumos y demás gastos se tendrían que comprar por cajas, kilogramos o por litros, los nuevos costos serían los siguientes:

4.2.5.1 Costos reactivos. Un kg de K_2HPO_4 vale \$291.160, Un Kg de KH_2PO_4 vale \$145.000, un kg de Na_2SO_4 vale \$92.800 y un kg de TCA vale \$440.452.

4.2.5.2 Costos insumos. La caja de membranas millipore en nylon por 100 unidades cuestan \$751.687, la caja de unidades de filtración millipore tipo millex por cien unidades cuestan \$1.283.610, la caja de tubos cóncavos para centrifuga por 50 unidades cuestan \$174.928, la caja de jeringas por 80 unidades cuesta \$50.344 y la pastilla de cuajo para la preparación de lactosuero cuesta \$1.000.

4.2.5.3 Costos agua tipo I. El litro de agua tipo I cuesta \$80.000.

4.2.5.4 Costos columna y precolumna. La columna de exclusión molecular shodex KW-802.5 tiene un costo de \$3.563.973,9 y una pre-columna con un costo de \$1.430.366,4.

4.2.5.5 Equipos. El equipo de cromatografía líquida de alta eficacia que comprende los reservorios, bomba A y B, automuestreador, horno con termostato, detector PDA, integrador de valle a valle, tiene un valor de \$150.000.000, la centrifuga refrigerada tiene un valor de \$4.500.000, el equipo de filtración a vacío tiene un valor de \$750.000, el potenciómetro tiene un valor de \$4.000.000, el baño ultrasonido tiene un valor de \$3.000.000 y la balanza analítica tiene un valor de \$2.000.000.

Tabla 19. Costos totales implementación en la empresa.

Ítem	Costo
Reactivos	\$969.412
Insumos	\$2.261.569
Agua tipo I	\$80.000
Columna y precolumna	\$4.994.340
Equipos	\$164.250.000
TOTAL	\$172.555.321

El costo total si la empresa productos naturales de la sabana S.A desea implementar la técnica en la empresa tiene un costo total de \$172.555.321.

Suponiendo que un proveedor de la empresa esté realizando este tipo de adulteraciones al 10 %, y el proveedor más pequeño que tiene la empresa posee un número de vacas mínimo de 32, por lo que se decidió hacer un análisis para las pérdidas anuales.

Tabla 20. Análisis costo beneficio.

Ítem	Cantidad
Numero de vacas	32
Litros de leche por vaca	15
Litros al día	480
Adición de suero 10%	0,1
Suero recibido (L/día)	48
Costo leche (L)	\$1.000
Pérdidas al día	\$48.000
Pérdidas al año	\$17.520.000

Las pérdidas anuales por un proveedor que esté realizando estas adulteraciones al 10% son de \$17.520.000. Por lo que se estaría recuperando el costo invertido de este tipo de adulteración con lactosuero.

5. CONCLUSIONES

- Adulteraciones mayores al 15% de lactosuero generan un deterioro visible en las propiedades fisicoquímicas de leche.
- El método desarrollado permite un análisis de las muestras a través de una regresión lineal en la que se obtiene una curva de calibración con un $R^2 > 0,99$ que determina la cantidad de adulteración.
- Teniendo en cuenta las implicaciones legales que tiene este tipo de adulteración se considera una técnica económica para empezar a controlar el fraude de una manera más segura y efectiva.
- En Colombia no se ha desarrollado una técnica que permita cuantificar esta adulteración, por lo que a partir de este trabajo se puede proponer una metodología para generar una normativa.

Como resultado del trabajo desarrollado este último año se participó en el XIII Congreso latinoamericano de microbiología e higiene de alimentos obteniendo el primer puesto al mejor trabajo de pregrado del premio ACTA 40 años.

6. RECOMENDACIONES

- La adulteración de la leche sigue siendo una preocupación, los esfuerzos deben ser hechos por las autoridades reguladoras, los productores, los procesadores y los proveedores a fin de proteger la calidad y autenticidad del producto.
- El tiempo de análisis para este tipo de pruebas es de dos horas teniendo en cuenta la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético de una hora, centrifugación de 10 minutos, estabilización de la fase móvil para la corrida de 15 minutos y corrida cromatográfica de 35 minutos.
- Cuando la leche se adultera con concentraciones mayores al 15% el deterioro de la leche se puede observar a simple vista, por lo que se aconseja hacer un análisis entre los rangos de 12,5% y 15% para saber con exactitud en que porcentaje se empieza a evidenciar este deterioro.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de límite de detección se recomienda validar los resultados haciendo niveles de precisión a nivel laboratorio con análisis de reproducibilidad y repetitividad.

BIBLIOGRAFIA

AGUDELO GOMEZ, D. A. y BEDOYA MEJIA, O. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Antioquia, Colombia. Vol 2, No. 1 (enero- junio 2005); p. 38 - 42.

AGUILAR, M. HPLC of peptides and proteins methods and protocols. Australia. Humana Press, 2004. p. 3 – 4.

ALCAZAR MONTAÑEZ, C.D., ROSAS RAMIREZ, J., JARAMILLO ARANGO, C. J. y PEÑA BETANCOURT, S. D. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. México. Vol. 31, No. 3. 2000; p. 217 - 222.

ALVARADO CARRASCO, C. y GUERRA, M. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. Venezuela. Vol. 23, No. 1. 2010; p 42 – 49.

BARO, L., JIMENEZ, J., MARTINEZ FERREZ, A. y BOUZA, J. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. España. Vol. 42 No. 3-4. 2001; p. 135 – 145.

BRUNSER, O. El papel de las bifidobacterias en el funcionamiento del organismo humano. Santiago, Chile. Vol. 40, No. 3 (27, agosto, 2013); p. 303 – 308.

EL-SALAM, M. H., EL-SHIBINY, S. y BUCHHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macropéptide. El Cairo, Egipto. Vol. 6, No. 4. 1996; p 327 – 341.

GALINDO AMAYA, L. M., COLMENARES, E. V. y VILLAROEL, E.R. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. Maracaibo, Venezuela. Vol. 16, No. 3. 2006; p. 308 – 314.

GUEVARA GARAY, L. U., CUERTAS CASTAÑO, D. A. y LLANO NARANJO, F. Kappa caseína de la leche: aspectos bioquímicos, moleculares, productivos y nutricionales. Risaralda, Colombia. Vol. 20 No. 1. 2014; p. 29 – 33.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El instituto, 1998.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El instituto, 2008.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónica. NTC 4490. Bogotá: El instituto, 1998.

ISIDRA RECIO, M. R., GARCIA RISCO, R. L. y AGUSTIN OLANO, M. R. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. Madrid, España. Vol. 10, No. 5. 2000; p. 333 – 338.

MIRALLES BURAGLIA, B. Detección de caseinato y suero en leche y productos lácteos mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectroscópicas. Madrid, España. 2001; p. 1 – 231.

Norma Oficial. Investigación del suero de leche en polvo en la leche desnatada al almacenamiento público mediante determinación de los glicomacropéptidos por cromatografía líquida de alto rendimiento. Vol. 1, No. 1. 2001; p. 63 - 68.

PARRA HUERTAS, R. A. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Medellín, Colombia. Vol. 62, No. 1. 2009; p. 4967 – 4982.

PARZANESE, M. Tecnologías para la industria alimentaria. Procesamiento de lactosuero. Alimentos Argentinos, una elección natural; p. 1 – 9 disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Tecnologia/tecnologia/Ficha_13_Lactosuero.pdf.

RAJAN SHARMA, N. y BIMLESH MANN, Y.S. Chemical and functional properties of glycomacropéptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. India. Vol 93, No. 1. 2013; p. 21 - 43.

RAMIREZ AYALA, A., VEGA Y LEON, S., PRADO FLOREZ, G. Y GUTIEREZ, R. Aplicación de tres métodos analíticos para la detección de suero de quesería en leche UHT comercializada en la ciudad de México. Venezuela. Vol. 34, No. 6. (junio, 2009); p. 406 – 412.

RANGEL, A.C., RODRIGUEZ, V.C. y MARTINEZ, N. Determinación de adulterantes en leches crudas acopiadas en procesadoras de quesos en Montería. Córdoba, Colombia. Vol. 17, No. 2 (27, noviembre, 2013); p. 202 – 206.

Real Decreto. Método oficial de análisis de leche y productos lácteos. España. (3, enero, 1994); p. 62 – 64.

SALAMANCA, M. S. y RESTREPO SALAZAR, J.C. Características fisicoquímicas y microbiológicas de la leche cruda para consumo humano. Ministerio de la Protección Social, Decreto 1880 capítulo III, artículo 6 y 7. 2011; p. 4 – 5.

TRIANA, L. Determinación de suero de quesería en la leche fluida y en polvo. Método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Norma Técnica Ecuatoriana. NTE 2401. 2008. P. 1 – 12.

URBAN, G., PEREZ, N., VEGA, S., FRESAN, C., PEREZ, J., PRADO, G., GONZALEZ, M., GONZALES, C. y RAMIREZ, A. Separación por electroforesis (PAGE-SDS) del caseinomacropéptido liberado por quimosina sobre la k-caseína. Efecto de proteólisis por bacterias psicrótrofas. México D.F. Vol. 26, No. 2. 1998; p. 110 – 120.

ANEXOS

ANEXO A

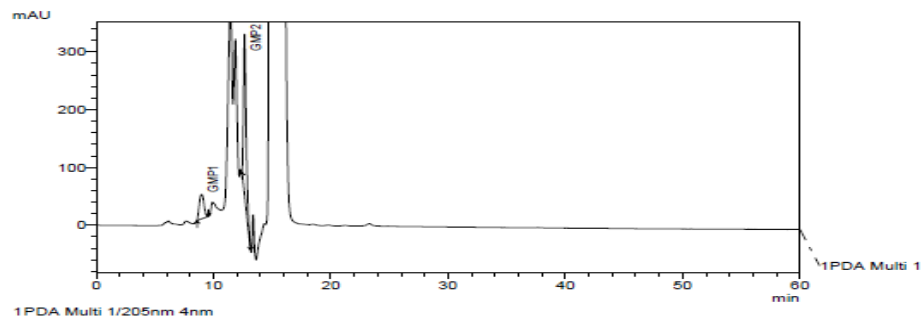
CROMATOGRAMA DE DURACIÓN DE TIEMPO DE CORRIDA

Figura 6. Duración tiempo de corrida.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : Leche10-3
Sample ID : Leche10-3
Operator : Ricardo Vera
Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche10-3_2.lcd
Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
Report File Name : Default.lcr
Acquisition Date : 16/02/03 1:31:07 PM
Modified Date : 16/02/03 2:34:56 PM

<Chromatogram>



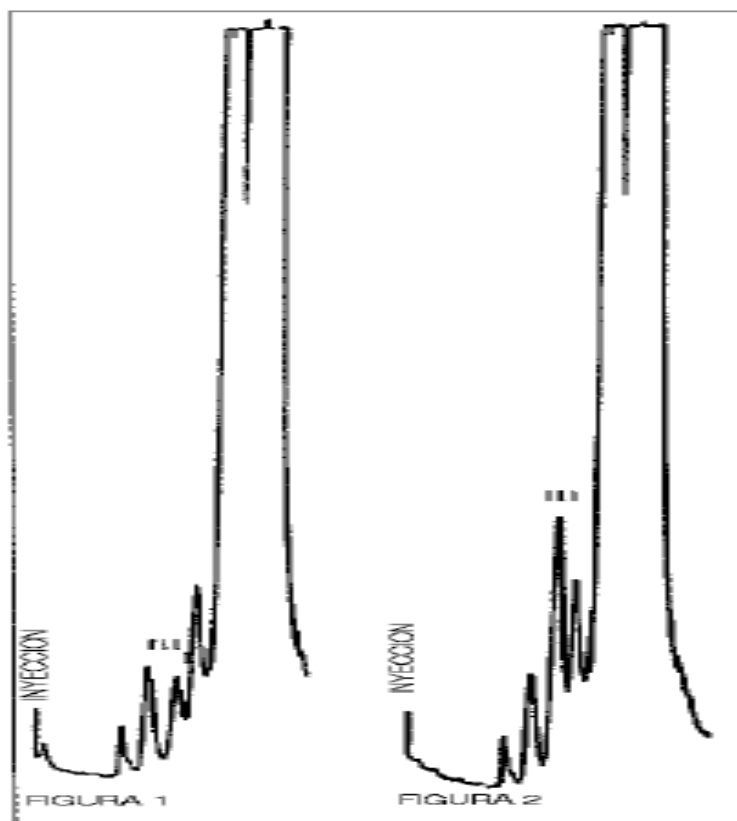
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	8.979	1174966	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	12.639	4299674	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO B

CROMATOGRAMAS REFERENCIADOS EN LA NORMA ECUATORIANA

Figura 7. Referencia norma ecuatoriana.



ANEXO C

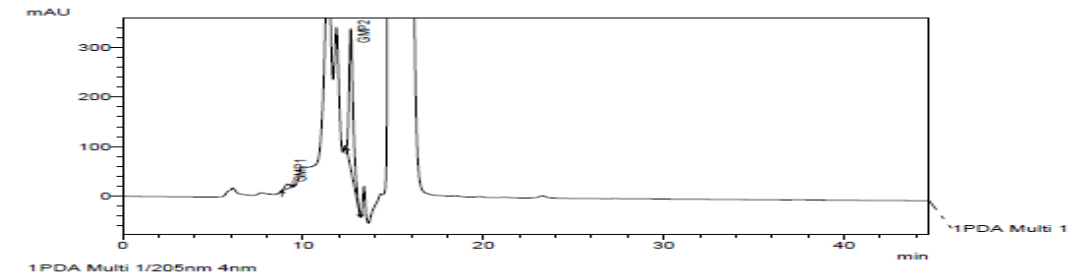
CROMATOGRAMA DE MUESTRA SIN TIEMPO DE ADULTERACIÓN

Figura 8. Prueba sin tiempo de adulteración.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : Leche0-2
Sample ID : Leche0-2
Operator : Ricardo Vera
Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche0-2_1.lcd
Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
Report File Name : Default.lcr
Acquisition Date : 16/02/03 12:45:55 PM
Modified Date : 16/06/29 10:17:05 AM

<Chromatogram>



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.124	177833	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	12.641	4385094	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO D

CROMATOGRAMAS ADULTERACIÓN DE MUESTRAS 0% 2,5% 5% 7,5% 10% 12,5% Y 15%.

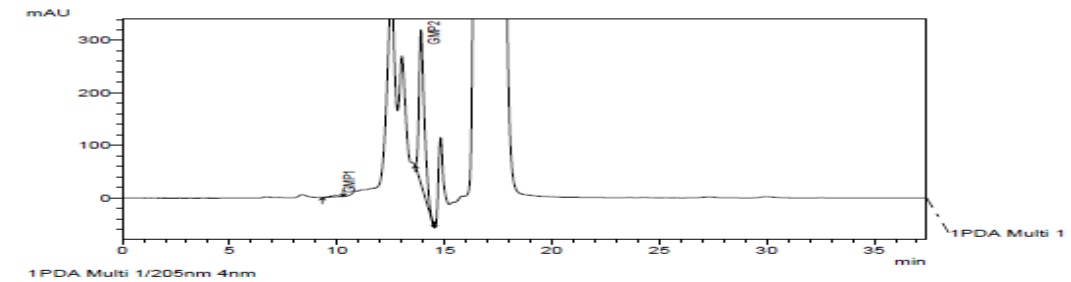
Figura 9. Adulteraciones en rangos de 0%- 15%.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

```

Sample Name       : Leche
Sample ID        : Leche
Operator         : Ricardo Vera
Data File Name   : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche_2.lcd
Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
Batch File Name  : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
Report File Name : Default.lcr
Acquisition Date: 15/12/16 1:16:21 PM
Modified Date    : 16/04/08 12:57:54 PM
    
```

<Chromatogram>



<Results>

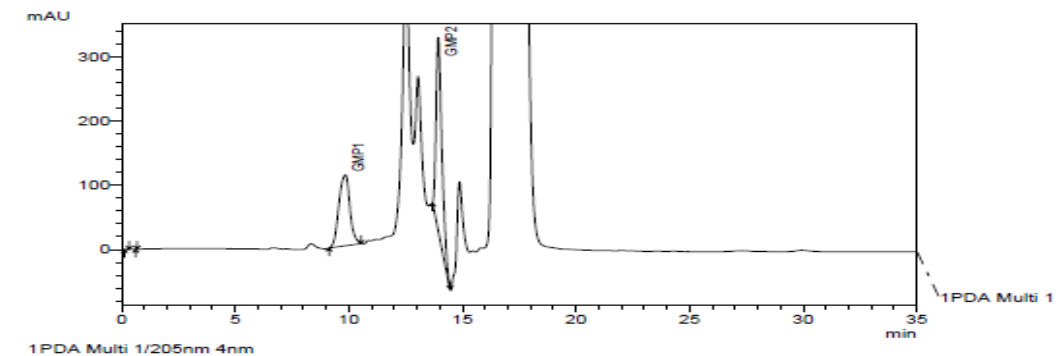
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.938	73882	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.904	4983110	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

```

Sample Name       : 2.5
Sample ID        : 2.5
Operator         : Ricardo Vera
Data File Name   : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\2.5_1.lcd
Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
Batch File Name  : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
Report File Name : Default.lcr
Acquisition Date: 15/12/17 12:06:52 PM
Modified Date    : 15/12/17 3:53:36 PM
    
```

<Chromatogram>



<Results>

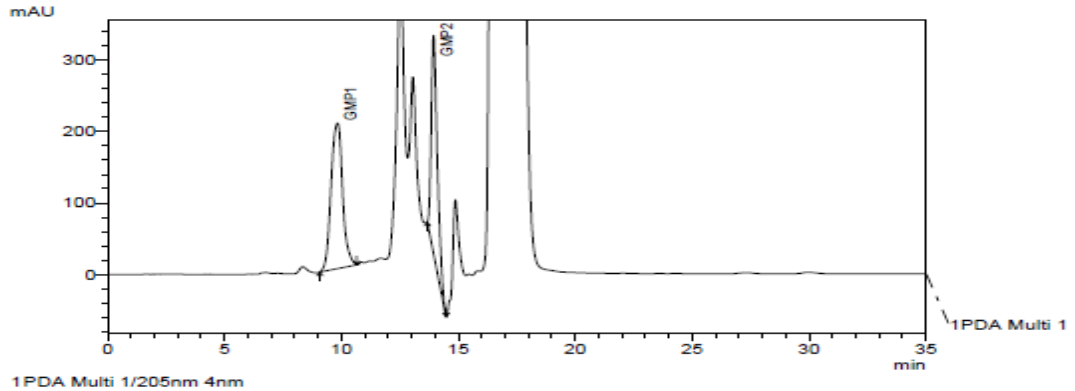
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.841	3718322	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.929	5262733	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 9. (Continuación).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 5
 Sample ID : 5
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\5_2.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 15/12/17 12:42:21 PM
 Modified Date : 15/12/17 3:53:51 PM

<Chromatogram>



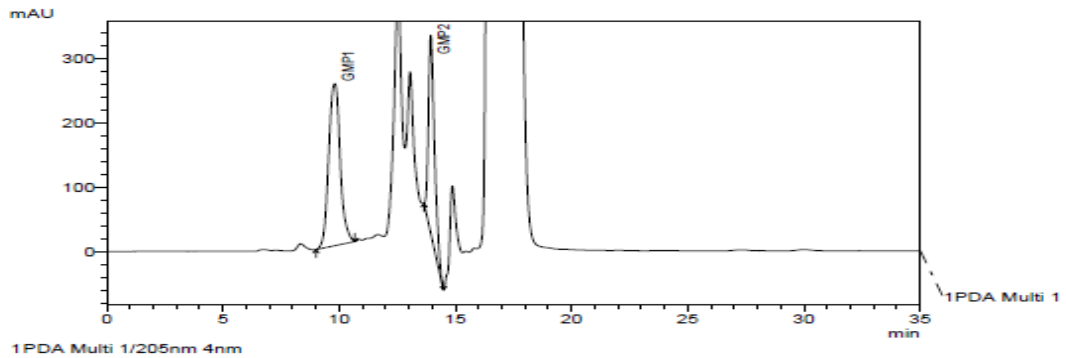
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.828	6993845	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.938	5464451	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 7.5
 Sample ID : 7.5
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\7.5_3.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 15/12/17 1:17:50 PM
 Modified Date : 15/12/17 3:54:03 PM

<Chromatogram>



<Results>

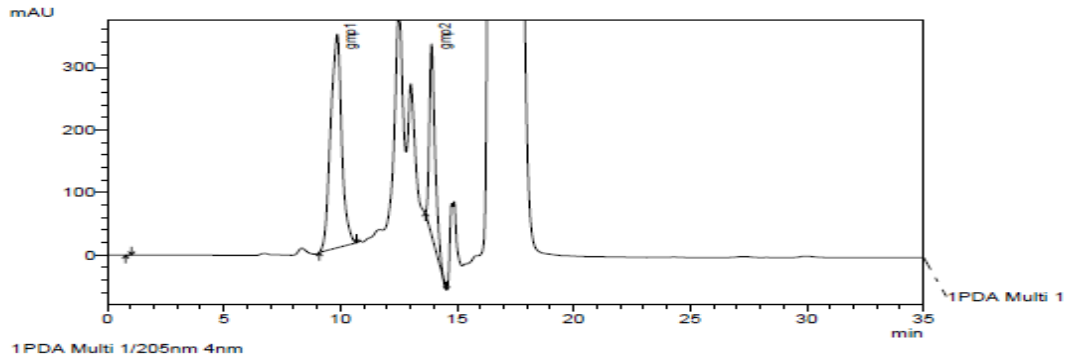
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.803	8647475	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.937	5564045	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 9. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 10
 Sample ID : 10
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\10_1.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 15/12/16 5:41:25 PM
 Modified Date : 16/04/08 12:24:22 PM

<Chromatogram>



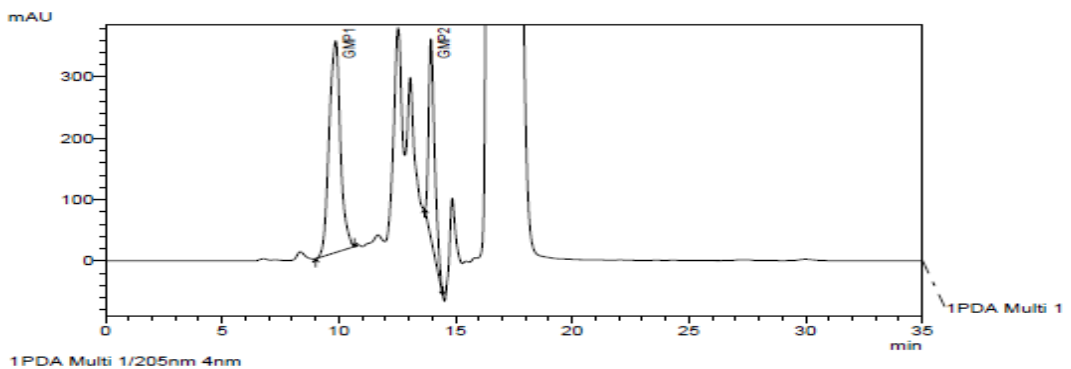
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	gmp1	9.858	11276738	Not calculated	0.000	mg/L
2	gmp2	13.899	5146708	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 12.5
 Sample ID : 12.5
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\12.5_5.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 15/12/17 2:28:49 PM
 Modified Date : 15/12/17 3:54:33 PM

<Chromatogram>



<Results>

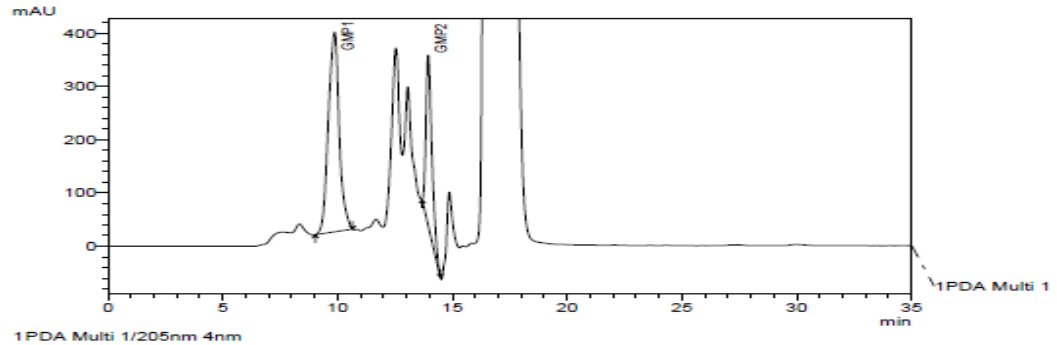
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.891	11600136	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.941	5800816	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 9. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 15
Sample ID : 15
Operator : Ricardo Vera
Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\15_6.lcd
Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
Report File Name : Default.lor
Acquisition Date : 15/12/17 3:04:17 PM
Modified Date : 16/02/02 4:37:47 PM

<Chromatogram>



<Results>

PDA						
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.867	12346677	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.943	5737506	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO E

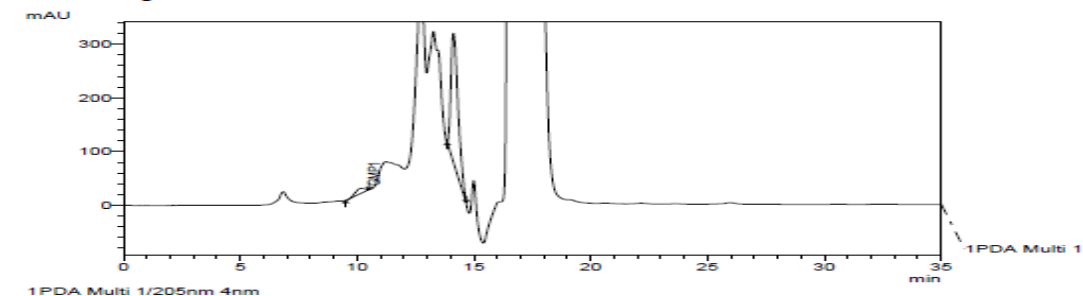
CROMATOGRAMAS DE PRUEBAS DE OBTENCIÓN DE LACTOSUERO

Figura 10. Pruebas obtención de lactosuero a partir de diferentes procesos y tratamientos (leche cruda, lactosuero polvo, lactosuero estándar, lactosuero liofilizado y lactosuero casero).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : lechecruda
 Sample ID : lechecruda
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\lechecruda_2.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/10 10:36:24 AM
 Modified Date : 16/02/10 2:13:01 PM

<Chromatogram>



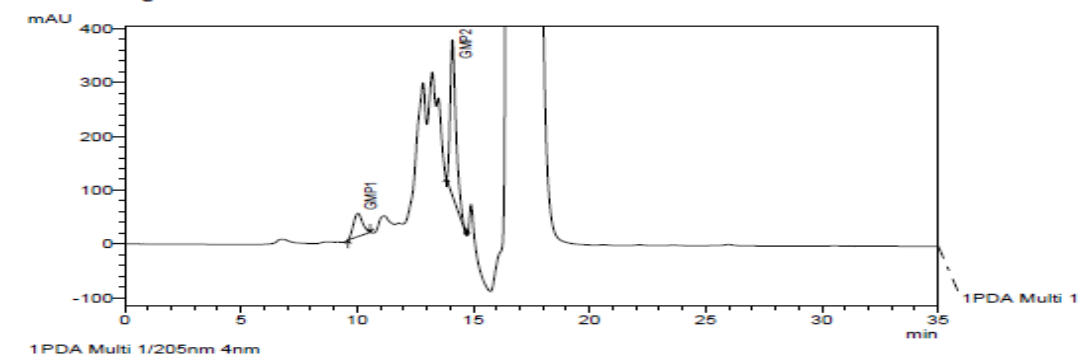
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.170	270361	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.091	2780315	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : lact.polvo
 Sample ID : lact.polvo
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\lact.polvo_3.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/10 12:31:42 PM
 Modified Date : 16/04/25 2:51:30 PM

<Chromatogram>



<Results>

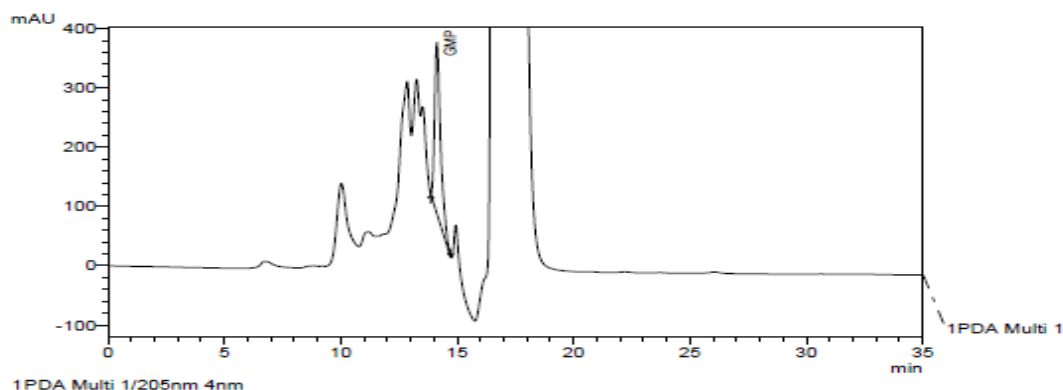
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.028	1180927	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.098	5030648	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 10. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : lact,liquido
 Sample ID : lact,liquido
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\lact,liquido_2.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/10 11:56:12 AM
 Modified Date : 16/02/10 2:18:00 PM

<Chromatogram>



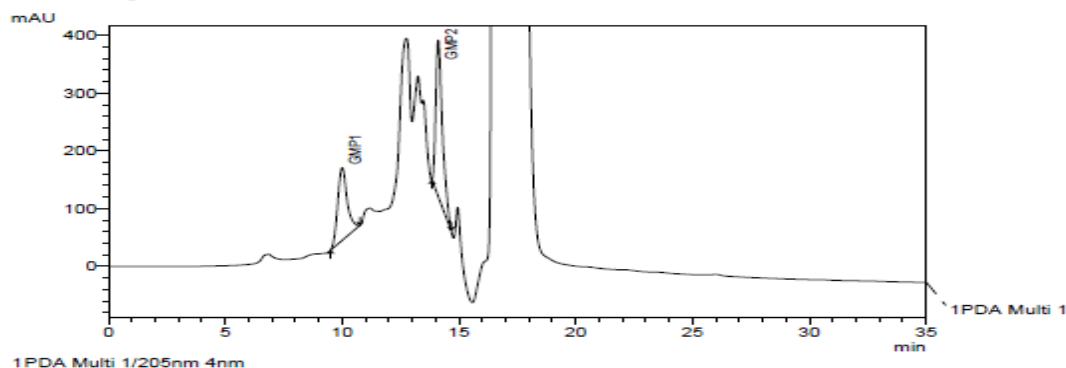
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP	14.124	5109997	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP	14.111	2819814	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : lact,lifilizado
 Sample ID : lact,lifilizado
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\lact,lifilizado_1.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/10 11:20:43 AM
 Modified Date : 16/04/25 2:44:52 PM

<Chromatogram>



<Results>

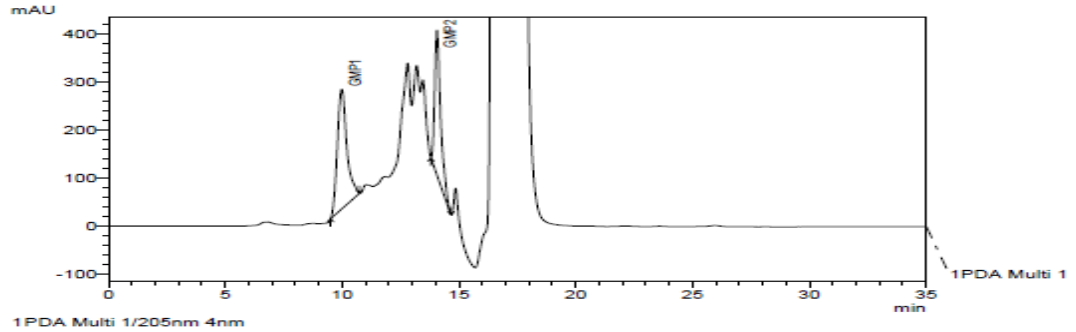
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.999	3569435	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.110	5355122	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 10. (Continuacion)

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : lact.dic
 Sample ID : lact.dic
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\lact.dic_4.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/10 1:07:09 PM
 Modified Date : 16/04/25 2:47:38 PM

<Chromatogram>



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.978	7118601	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.053	5298538	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO F

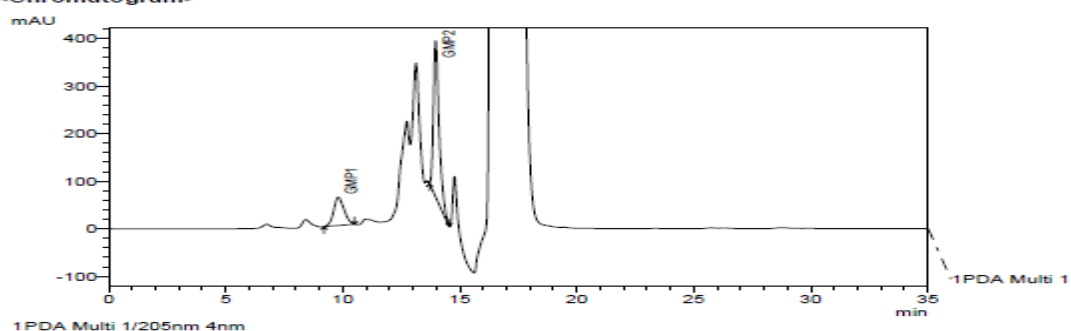
CROMATOGRAMAS DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

Figura 11. Pruebas coagulación enzimática al 5%.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1/70 5%-1
 Sample ID : 1/70 5%-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1\$70 5%-1_8.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/22 2:13:00 PM
 Modified Date : 16/02/25 10:16:19 AM

<Chromatogram>



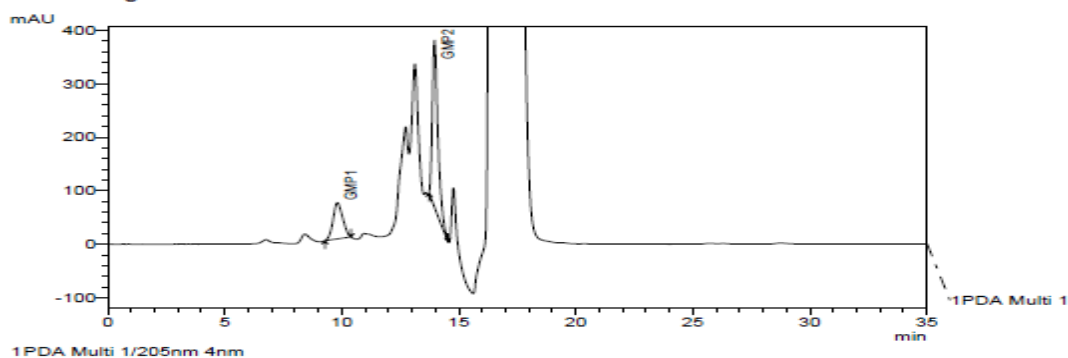
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.801	1822582	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.963	5482812	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1/50 5%-2
 Sample ID : 1/50 5%-2
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1\$50 5%-2_12.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/22 4:34:59 PM
 Modified Date : 16/02/25 10:17:58 AM

<Chromatogram>



<Results>

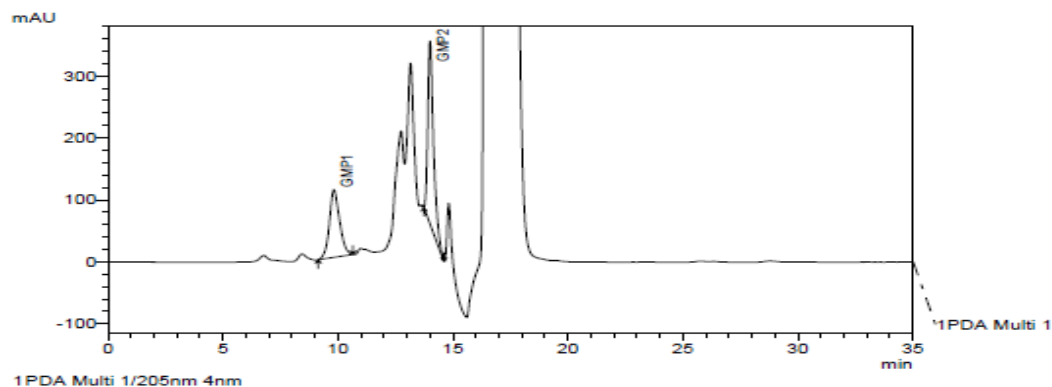
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.805	1931811	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.956	5145398	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 11. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1/30 5%-1
 Sample ID : 1/30 5%-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1\$30 5%-1_4.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/22 11:51:05 AM
 Modified Date : 16/02/25 10:14:11 AM

<Chromatogram>



<Results>

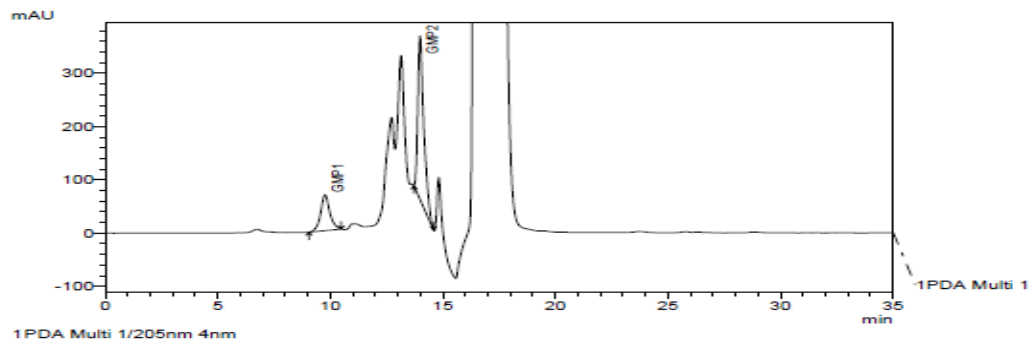
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.816	3367021	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.995	5087075	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 12. Coagulación enzimática al 10%.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1/70 10%-1
 Sample ID : 1/70 10%-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1\$70 10%-1_7.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/22 1:37:31 PM
 Modified Date : 16/02/25 10:15:53 AM

<Chromatogram>



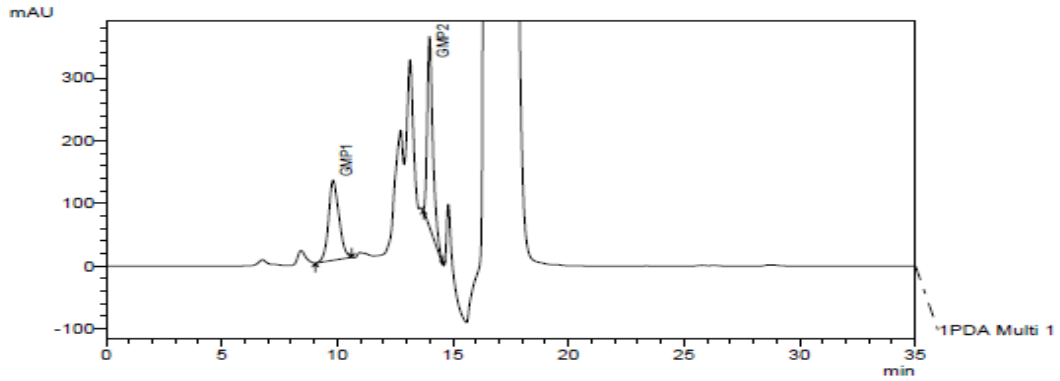
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.759	1906998	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.979	5681232	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1/50 10%-1
 Sample ID : 1/50 10%-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1550 10%-1_5.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/22 12:26:34 PM
 Modified Date : 16/02/25 10:14:52 AM

<Chromatogram>



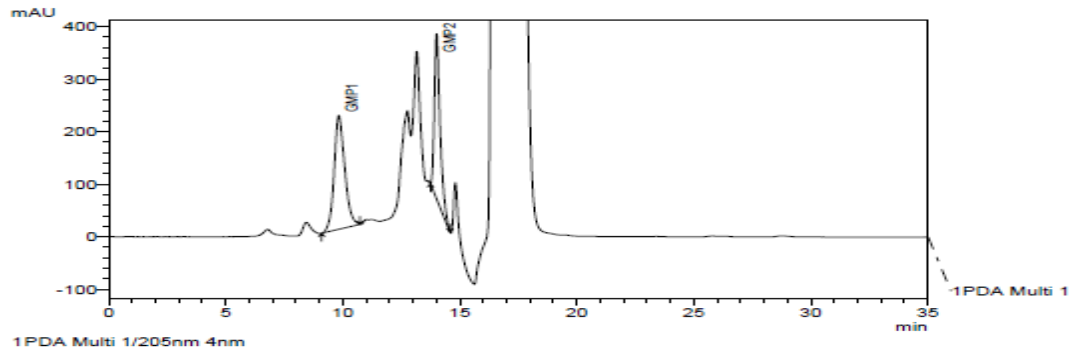
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.813	3991684	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.983	5111681	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1/30 10%-1
 Sample ID : 1/30 10%-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1530 10%-1_3.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/02/22 11:15:38 AM
 Modified Date : 16/04/05 9:28:33 AM

<Chromatogram>



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.822	6815480	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.003	5301442	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO G

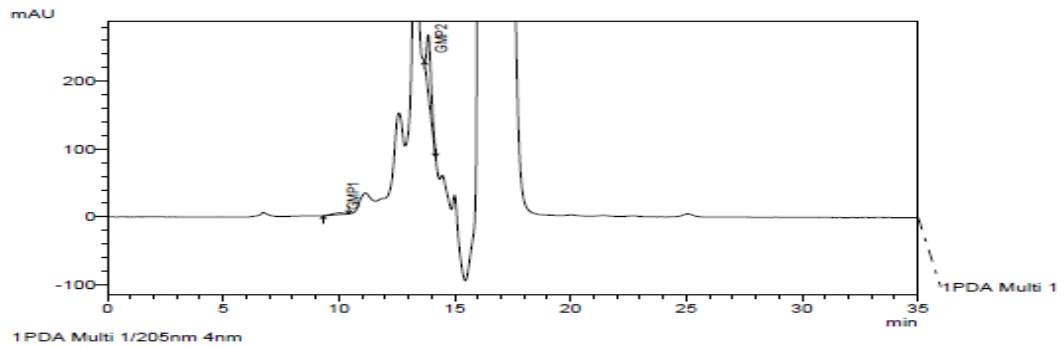
CROMATOGRAMAS DE MADURACIÓN DE LA LECHE (SÁBADO-VIERNES)

Figura 13. Pruebas maduración de la leche.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : sabC1
 Sample ID : sabC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\sabC1_1.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 2:25:38 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:42:46 AM

<Chromatogram>



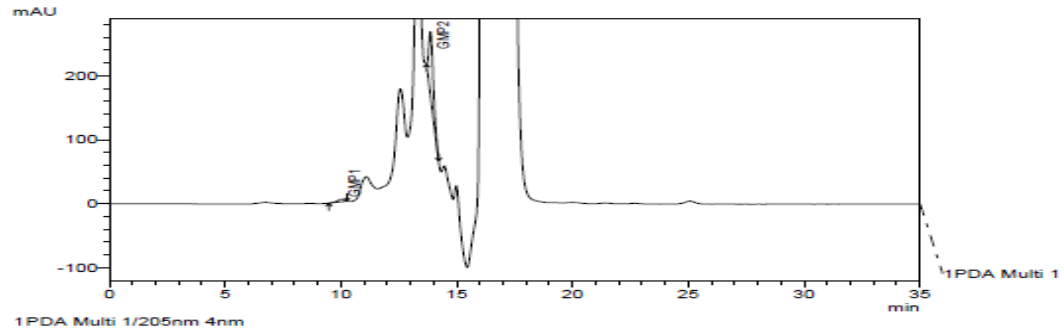
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.040	84568	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.851	1131175	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : domC1
 Sample ID : domC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\domC1_3.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 3:36:31 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:44:48 AM

<Chromatogram>



<Results>

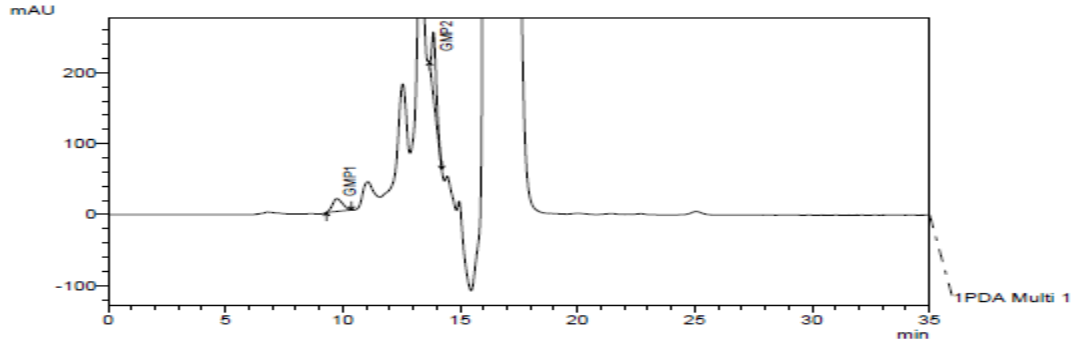
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.011	78697	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.859	1308799	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 13. (Continuación).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : lunC1
 Sample ID : lunC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\lunC1_5.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 4:47:26 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:48:21 AM

<Chromatogram>



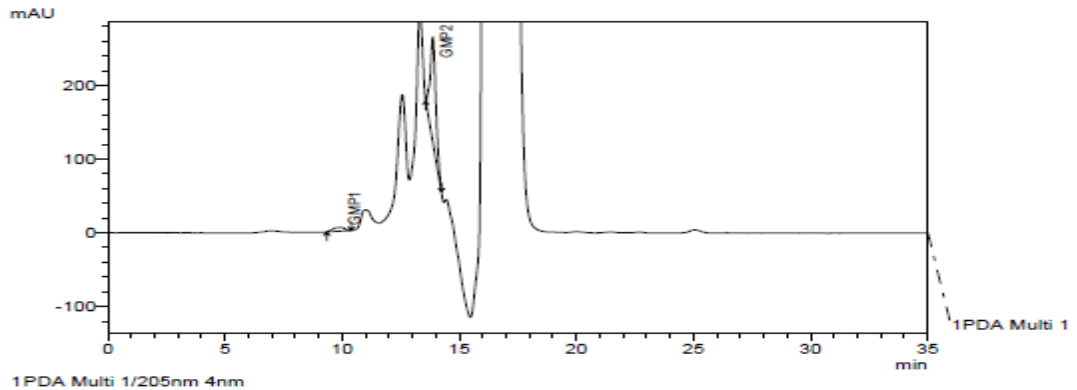
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.741	538309	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.857	1166264	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : marC1
 Sample ID : marC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\marC1_8.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 6:33:54 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:52:23 AM

<Chromatogram>



<Results>

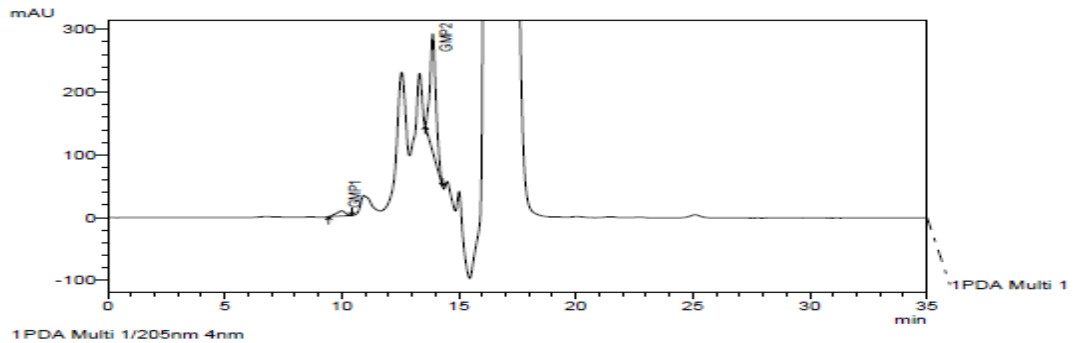
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.947	178237	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.867	2350653	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 13. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : mieC1
 Sample ID : mieC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\mieC1_11.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 8:20:20 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:55:01 AM

<Chromatogram>



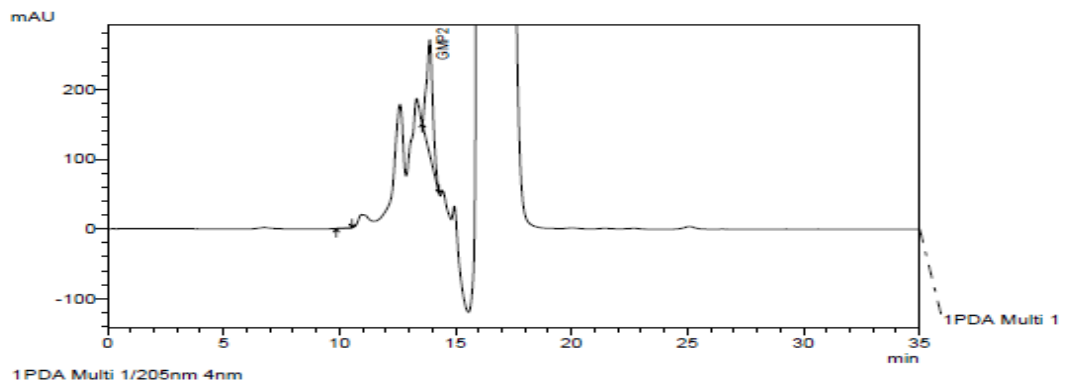
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.985	222008	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.881	3322578	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : jueC1
 Sample ID : jueC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\jueC1_14.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 10:06:48 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:56:41 AM

<Chromatogram>



<Results>

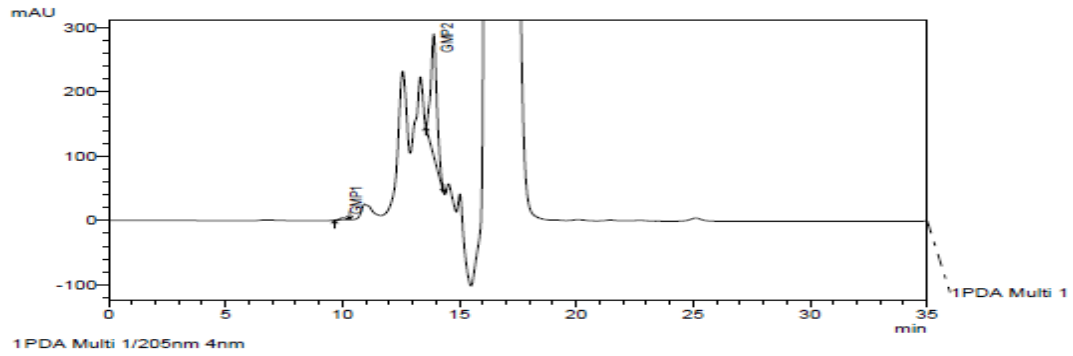
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	0.000	0	0	0.000	mg/L
2	GMP2	13.884	3008453	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 13. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : vieC1
 Sample ID : vieC1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\vieC1_17.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/11 11:53:16 PM
 Modified Date : 16/04/12 8:43:55 AM

<Chromatogram>



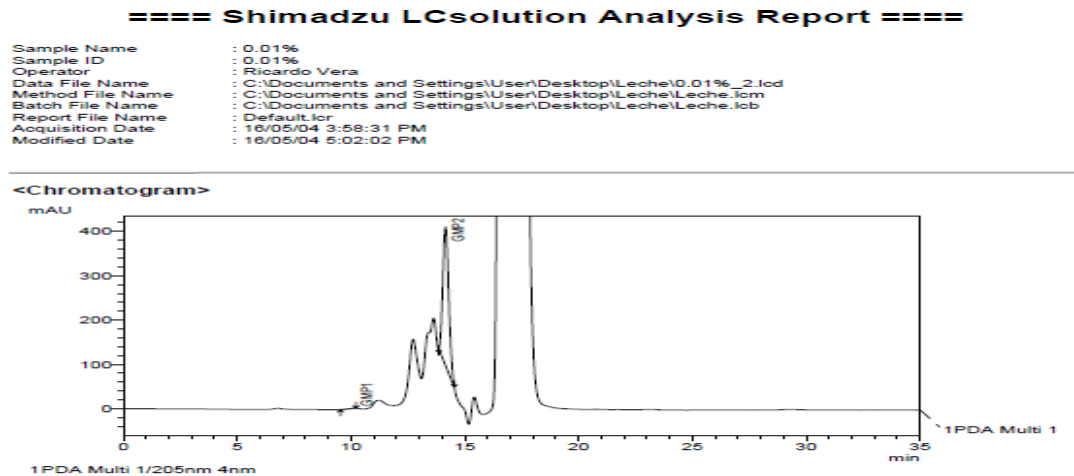
<Results>

PDA						
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.015	56653	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.895	3398945	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO H

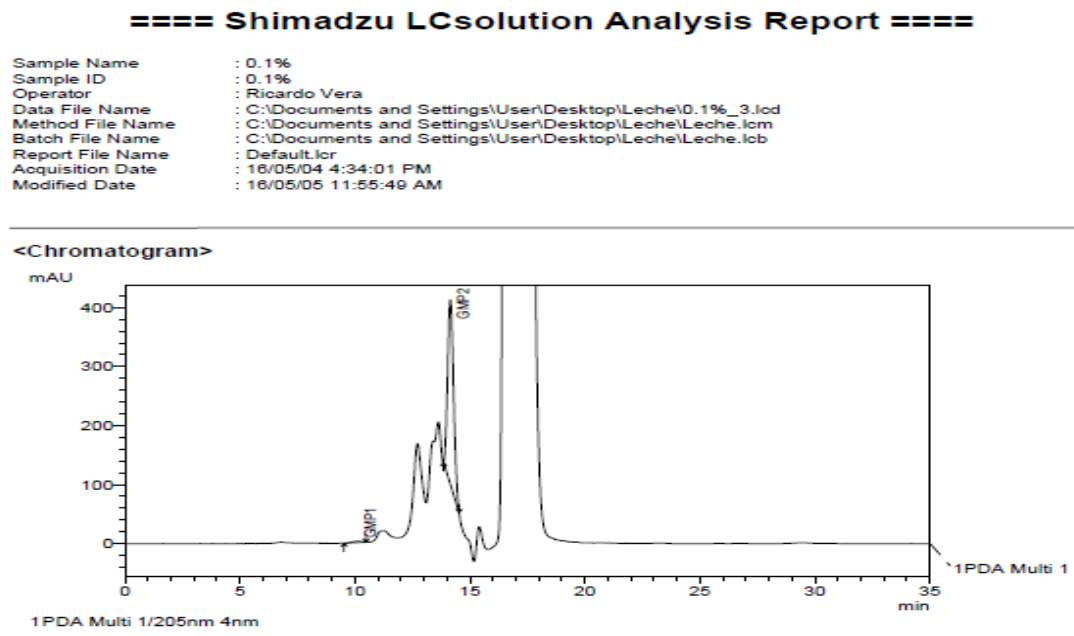
CROMATOGRAMAS DE LÍMITE DE DETECCIÓN (0,01%-2,5%)

Figura 14. Pruebas de límite de detección con acercamiento a la señal de referencia.



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.124	3781	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.145	5669046	Not calculated	0.000	mg/L



<Results>

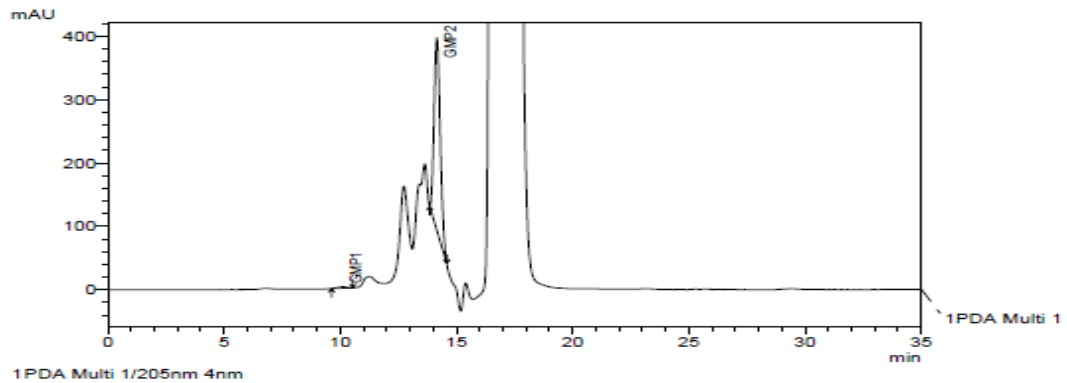
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.099	67626	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.140	5628901	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 14. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 0.5%
 Sample ID : 0.5%
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\0.5%_4.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/04 5:09:29 PM
 Modified Date : 16/05/05 11:56:19 AM

<Chromatogram>



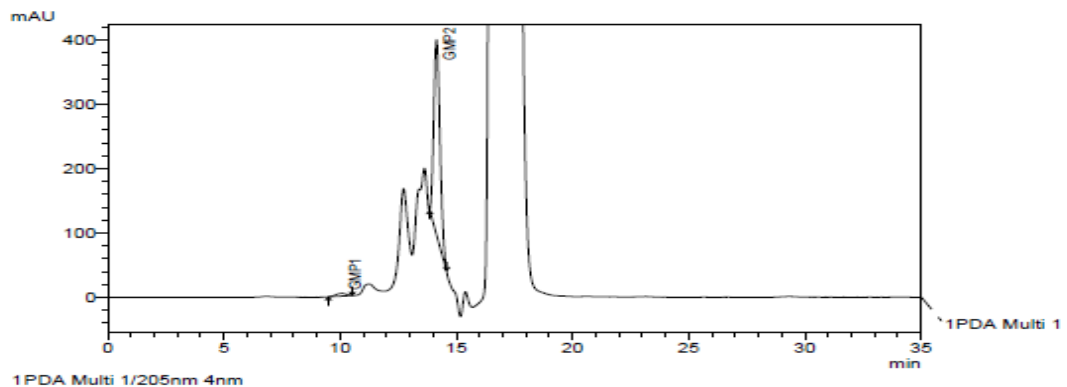
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.102	64446	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.150	5598791	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1%
 Sample ID : 1%
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1%_5.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/04 5:44:55 PM
 Modified Date : 16/05/05 11:56:43 AM

<Chromatogram>



<Results>

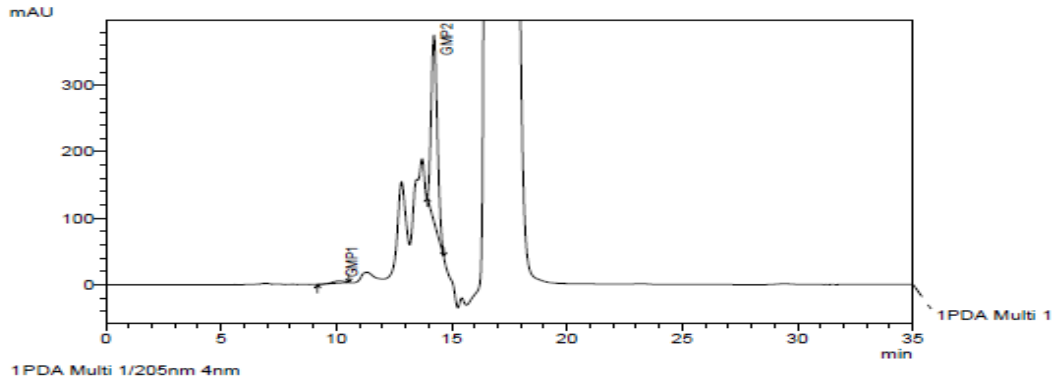
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.088	135994	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.141	5595135	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 14. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 1.5%
 Sample ID : 1.5%
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\1.5%_6.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/04 6:20:23 PM
 Modified Date : 16/05/05 11:57:12 AM

<Chromatogram>



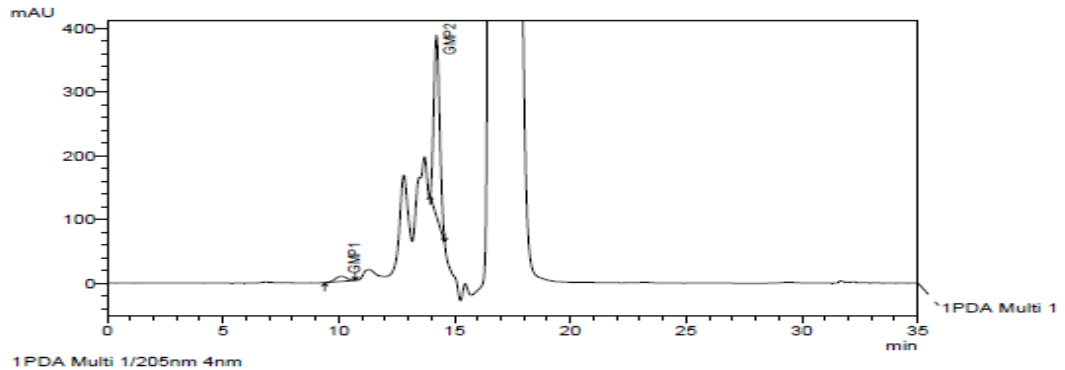
<Results>

PDA						
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.093	99326	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.226	5162396	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 2%
 Sample ID : 2%
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\2%_7.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/04 6:55:51 PM
 Modified Date : 16/05/05 11:58:00 AM

<Chromatogram>



<Results>

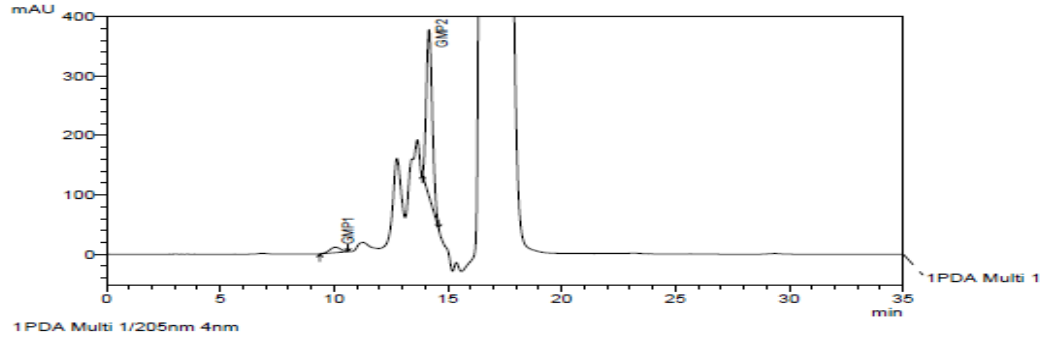
PDA						
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.110	279467	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.214	4990672	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 14. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 2.5%
 Sample ID : 2.5%
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\2.5%_8.icd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/04 7:31:20 PM
 Modified Date : 16/05/05 11:58:28 AM

<Chromatogram>



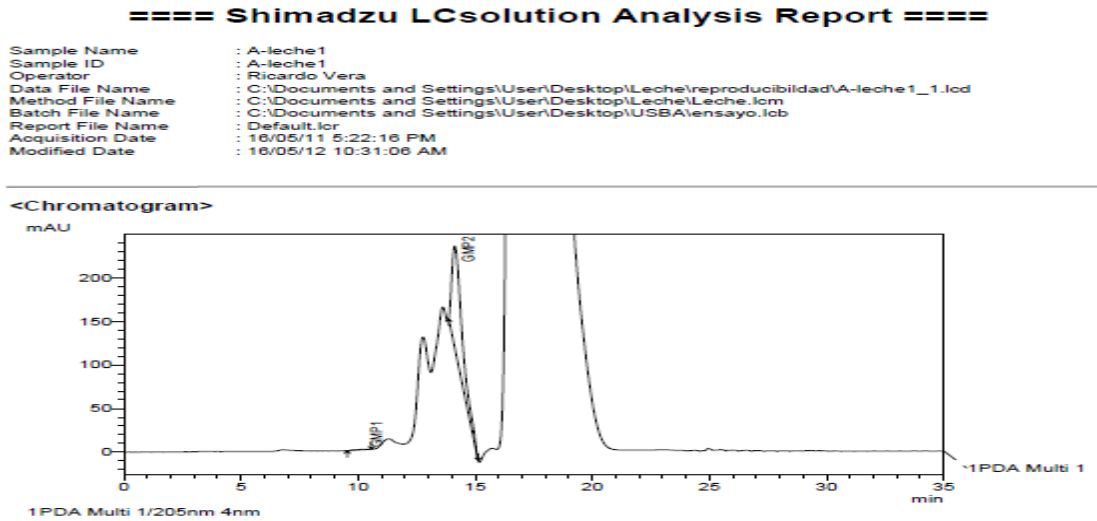
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.053	304887	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.165	5141139	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO I

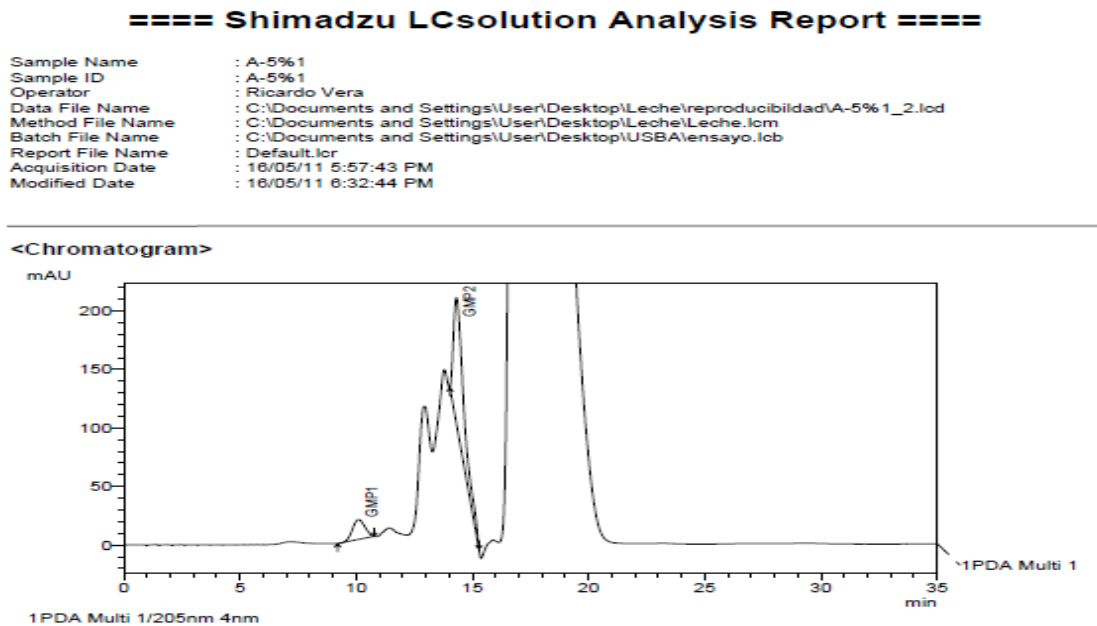
CROMATOGRAMAS DE REPRODUCIBILIDAD DE PERSONA N°1 (0%-15%)

Figura 16. Pruebas de reproducibilidad de persona N°1.



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.226	22994	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.121	3460028	Not calculated	0.000	mg/L



<Results>

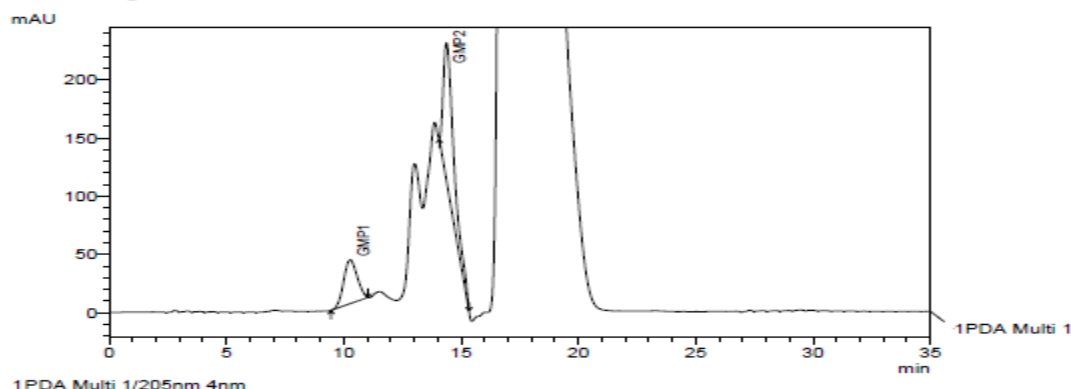
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	10.094	624701	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.309	3224777	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 16. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : A-10%1
 Sample ID : A-10%1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\reproducibilidad\A-10%1_3.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\USBA\ensayo.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/11 6:33:10 PM
 Modified Date : 16/05/11 7:08:13 PM

<Chromatogram>



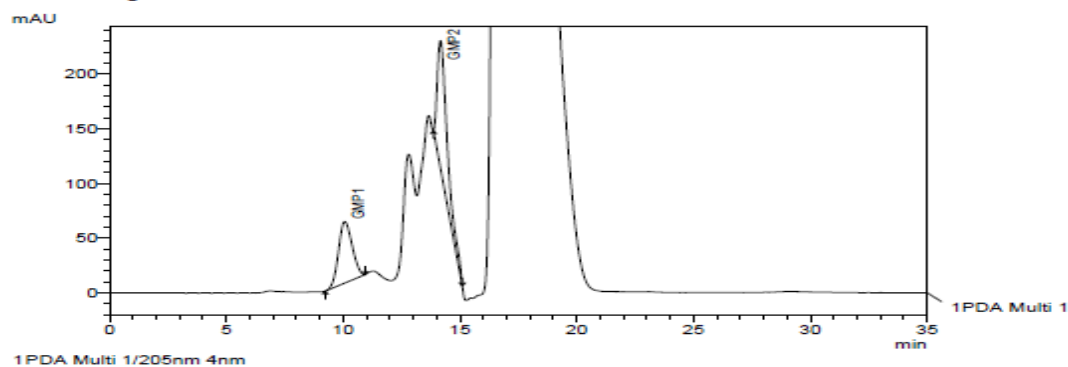
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.277	1510786	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.373	3590373	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : A-15%1
 Sample ID : A-15%1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\reproducibilidad\A-15%1_4.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\USBA\ensayo.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/11 7:08:39 PM
 Modified Date : 16/05/11 7:43:40 PM

<Chromatogram>



<Results>

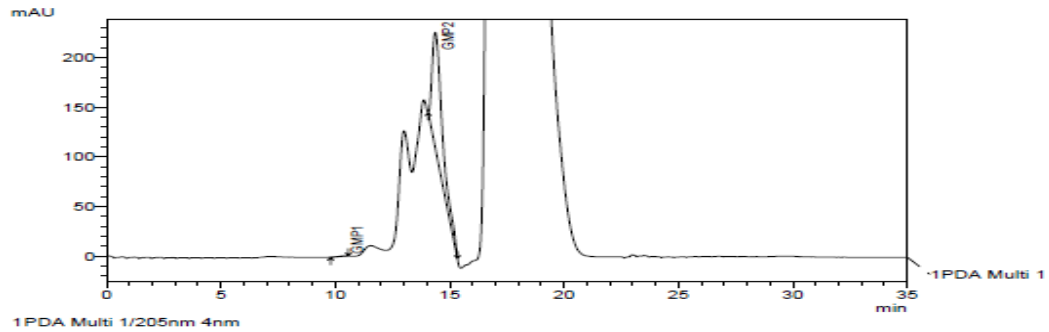
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.062	2287730	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.157	3347735	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 17. Pruebas de reproducibilidad de persona N°2.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : S-leche1
 Sample ID : S-leche1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\reproducibilidad\S-leche1_5.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\USBA\ensayo.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/11 7:44:06 PM
 Modified Date : 16/05/12 10:53:53 AM

<Chromatogram>



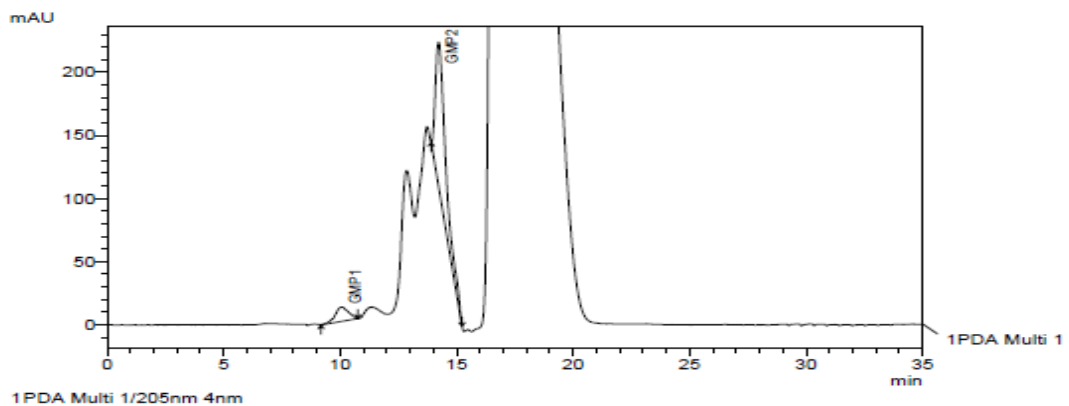
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.373	11007	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.364	3466601	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : S-5%1
 Sample ID : S-5%1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\reproducibilidad\S-5%1_6.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\USBA\ensayo.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/11 8:19:34 PM
 Modified Date : 16/05/11 8:54:36 PM

<Chromatogram>



<Results>

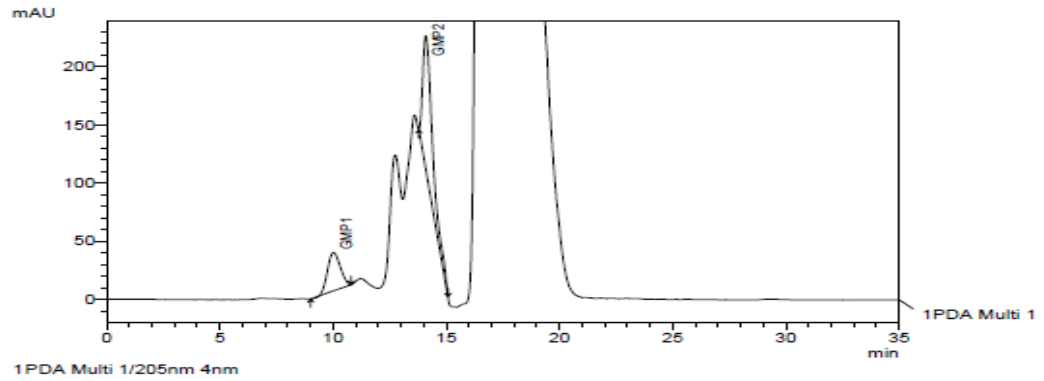
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.065	455134	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.219	3373316	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 17. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : S-10%1
 Sample ID : S-10%1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\reproducibilidad\S-10%1_7.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\USBA\ensayo.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/11 8:55:03 PM
 Modified Date : 16/05/11 9:30:05 PM

<Chromatogram>



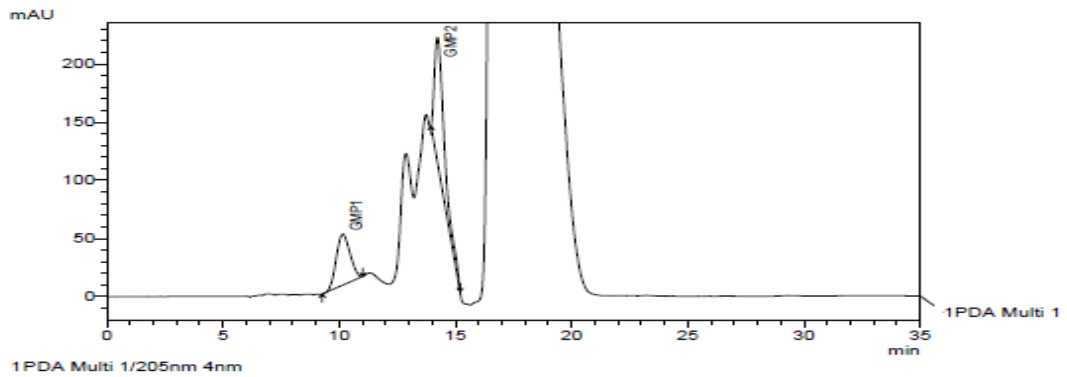
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.013	1283205	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.089	3311982	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : S-15%1
 Sample ID : S-15%1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\reproducibilidad\S-15%1_8.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\USBA\ensayo.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/05/11 9:30:32 PM
 Modified Date : 16/05/11 10:05:34 PM

<Chromatogram>



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	10.153	1801865	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.222	3029997	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO J

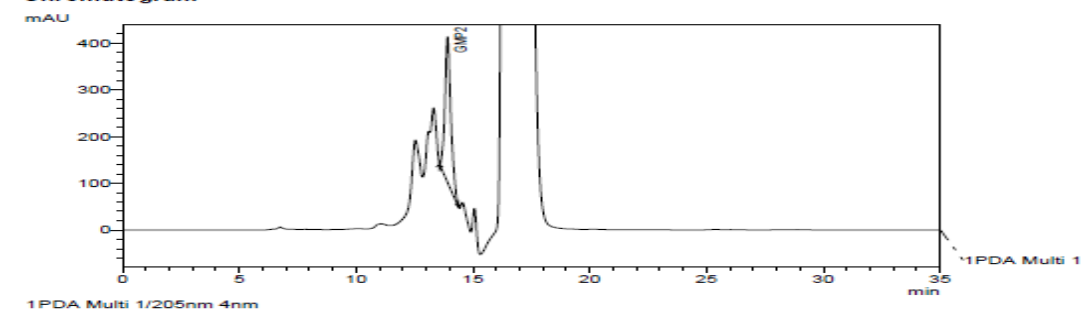
CROMATOGRAMAS DE REPETIBILIDAD A 3 HORAS DE ADULTERACIÓN

Figura 18. Pruebas de repetibilidad a 3 horas de adulteración.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : leche3h-1
 Sample ID : leche3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\leche3h-1_1.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 7:33:26 PM
 Modified Date : 16/04/15 11:17:06 AM

<Chromatogram>



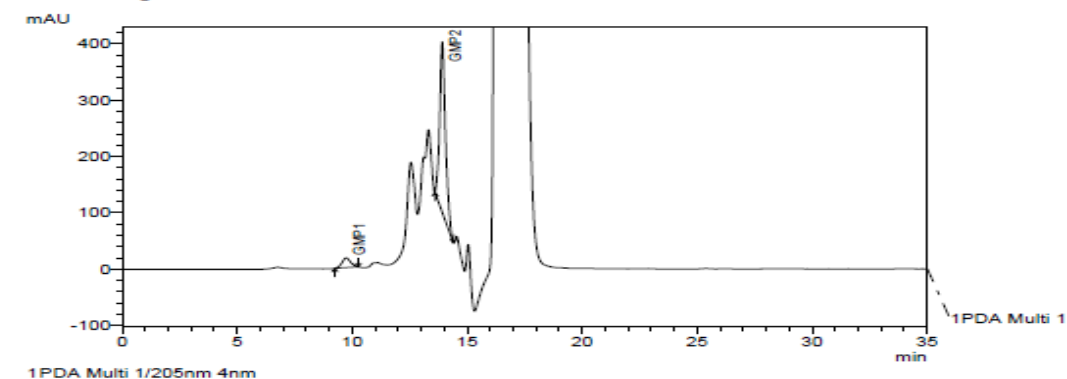
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	0.000	0	0	0.000	mg/L
2	GMP2	13.905	5470559	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 2.5%3h-1
 Sample ID : 2.5%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\2.5%3h-1_2.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 8:08:55 PM
 Modified Date : 16/04/13 8:43:57 PM

<Chromatogram>



<Results>

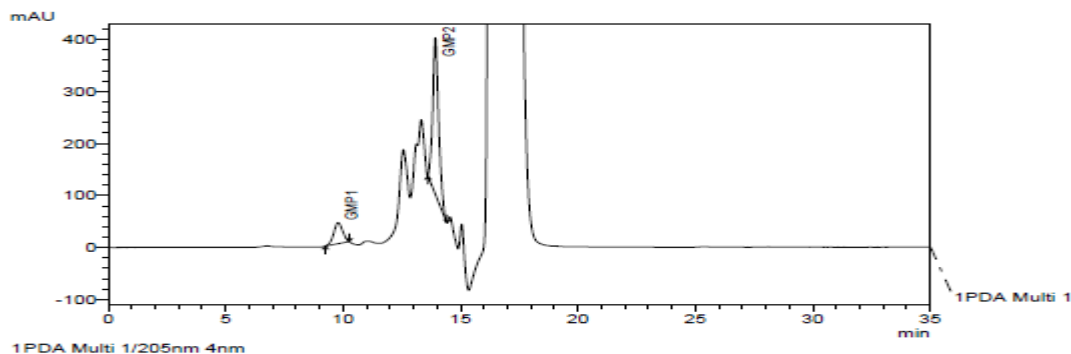
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.732	442098	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.908	5257581	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 18. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 5%3h-1
 Sample ID : 5%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\5%3h-1_3.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 8:44:24 PM
 Modified Date : 16/04/13 9:19:26 PM

<Chromatogram>



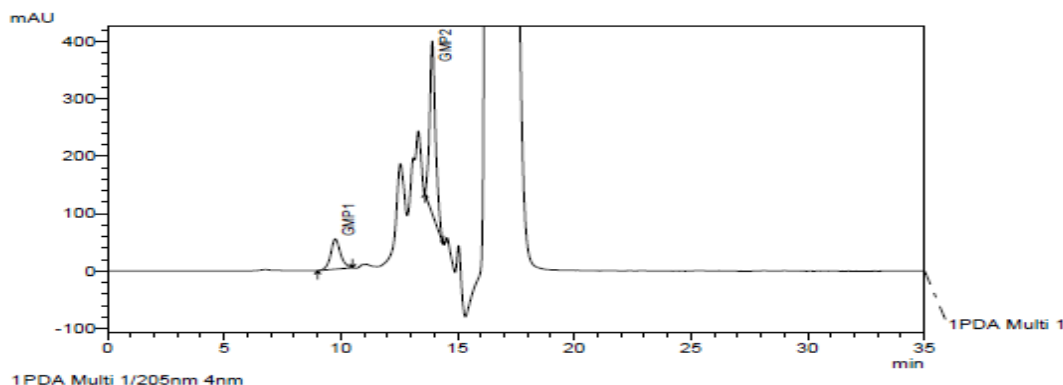
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.784	1063808	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.921	5250180	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 7.5%3h-1
 Sample ID : 7.5%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\7.5%3h-1_4.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 9:19:52 PM
 Modified Date : 16/04/13 9:54:56 PM

<Chromatogram>



<Results>

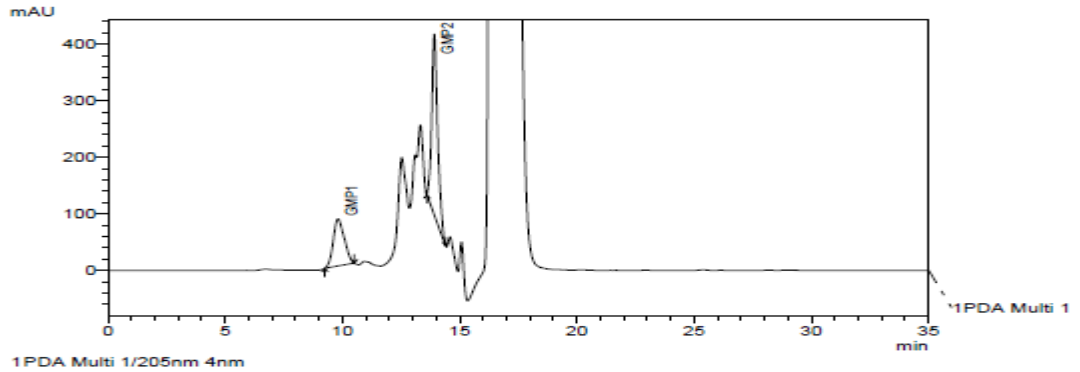
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.759	1536970	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.909	5279624	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 18. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 10%3h-1
 Sample ID : 10%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\10%3h-1_5.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 9:55:20 PM
 Modified Date : 16/04/15 11:34:33 AM

<Chromatogram>



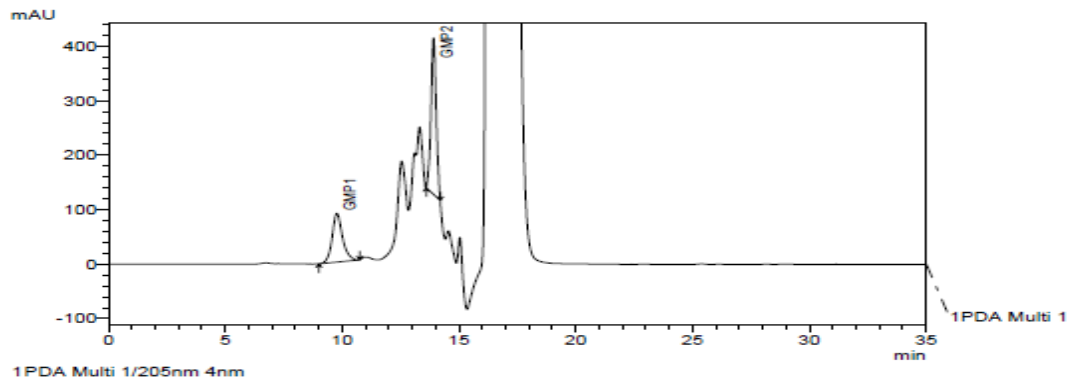
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.805	2714688	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.910	5576774	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 12.5%3h-1
 Sample ID : 12.5%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\12.5%3h-1_6.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 10:30:48 PM
 Modified Date : 16/04/15 6:42:11 PM

<Chromatogram>



<Results>

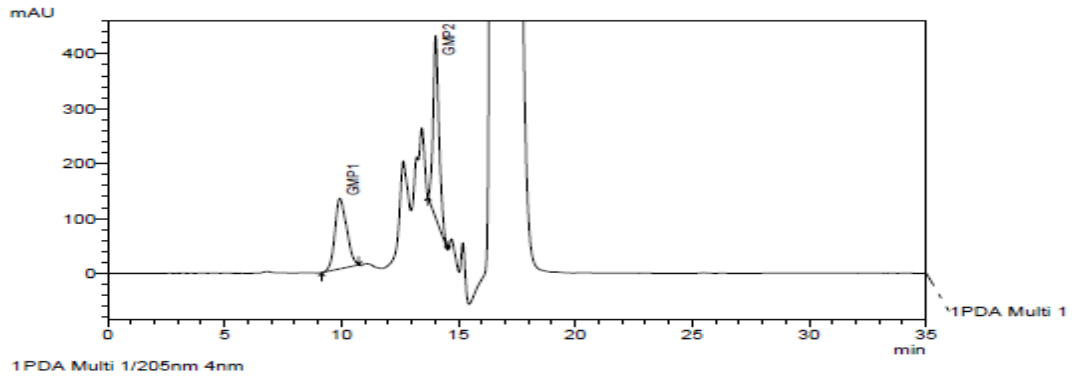
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.770	2759108	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.905	4403698	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 18. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 15%3h-1
 Sample ID : 15%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\15%3h-1_7.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 11:06:17 PM
 Modified Date : 16/04/13 11:41:18 PM

<Chromatogram>



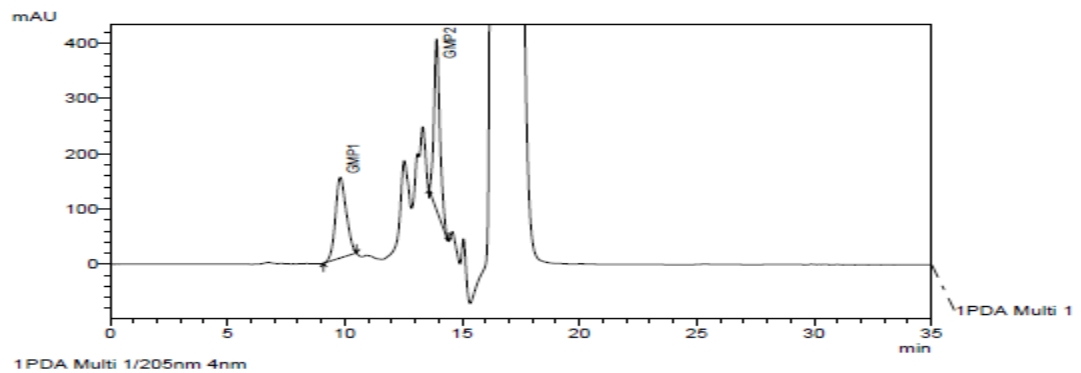
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.925	4489595	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	14.022	5801817	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 20%3h-1
 Sample ID : 20%3h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\20%3h-1_8.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/13 11:41:44 PM
 Modified Date : 16/04/14 12:16:46 AM

<Chromatogram>



<Results>

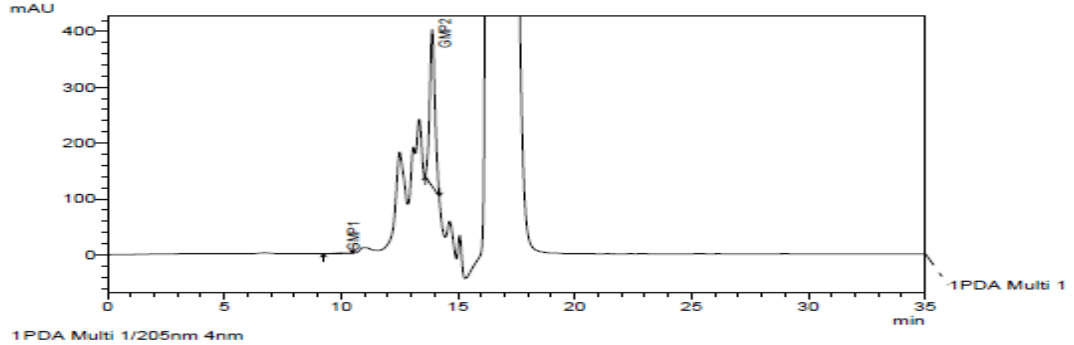
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	GMP1	9.802	4873529	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.906	5398807	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 19. Pruebas de repetibilidad a 8 horas de adulteración.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : leche8h-1
 Sample ID : leche8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\leche8h-1_33.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/14 2:28:48 PM
 Modified Date : 16/04/14 3:03:50 PM

<Chromatogram>



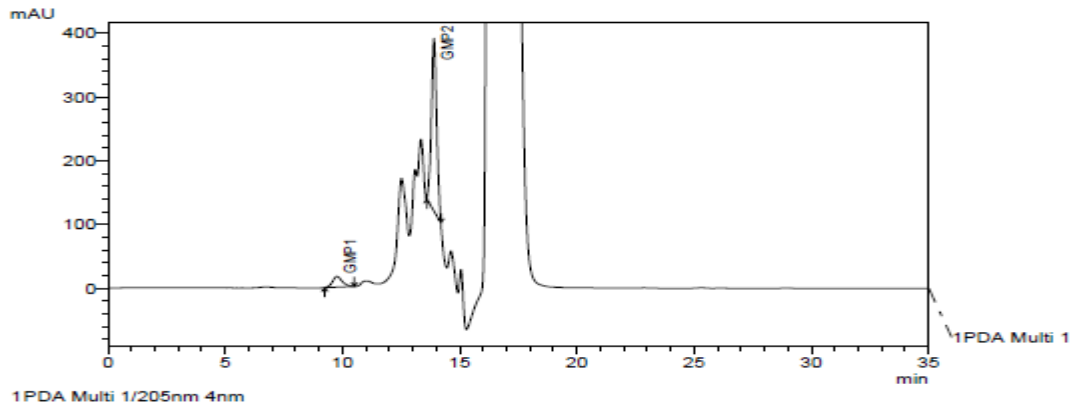
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.943	19011	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.892	4368076	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 2.5%8h-1
 Sample ID : 2.5%8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\2.5%8h-1_34.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/14 3:04:16 PM
 Modified Date : 16/04/14 3:39:18 PM

<Chromatogram>



<Results>

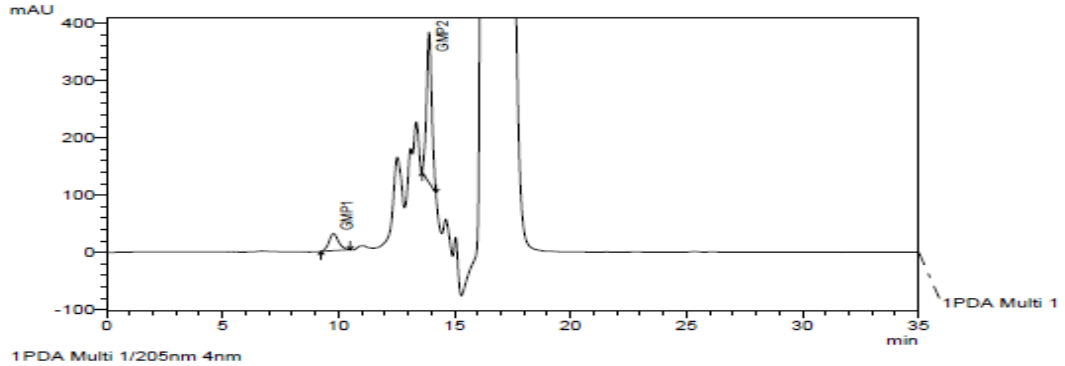
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.757	480752	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.896	4212489	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 19. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 5%8h-1
 Sample ID : 5%8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\5%8h-1_35.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/14 3:39:46 PM
 Modified Date : 16/04/15 2:38:31 PM

<Chromatogram>



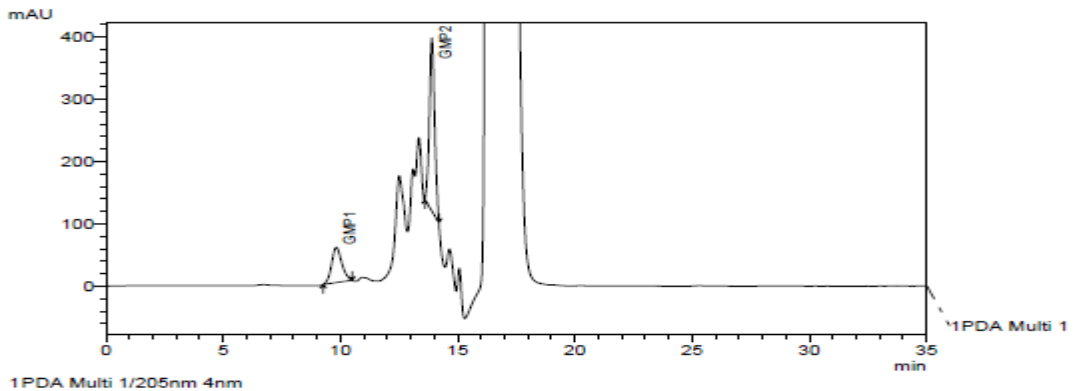
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.777	855360	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.895	4091023	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 7.5%8h-1
 Sample ID : 7.5%8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\7.5%8h-1_36.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/14 4:15:14 PM
 Modified Date : 16/04/14 4:50:16 PM

<Chromatogram>



<Results>

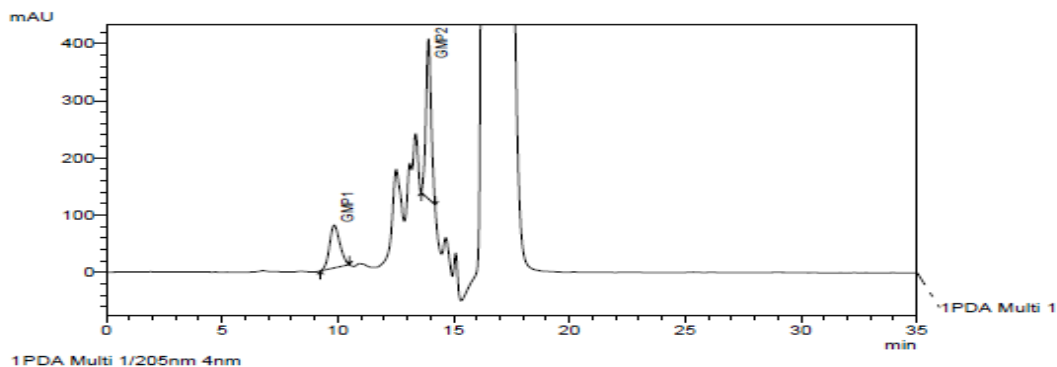
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.819	1704451	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.892	4312043	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 19. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 10%8h-1
 Sample ID : 10%8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\10%8h-1_37.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lor
 Acquisition Date : 16/04/14 4:50:43 PM
 Modified Date : 16/04/14 5:25:44 PM

<Chromatogram>



<Results>

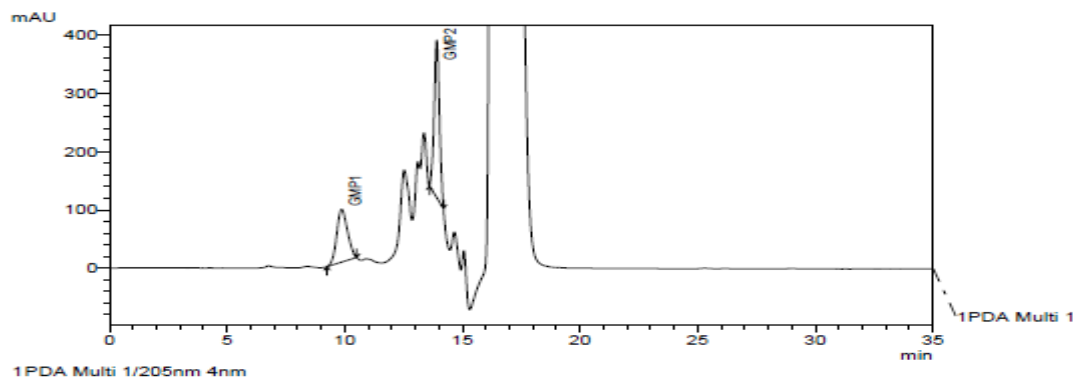
PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.837	2315193	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.807	4289021	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 12.5%8h-2
 Sample ID : 12.5%8h-2
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\12.5%8h-2_46.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lor
 Acquisition Date : 16/04/14 10:10:04 PM
 Modified Date : 16/04/14 10:45:08 PM

<Chromatogram>



<Results>

PDA

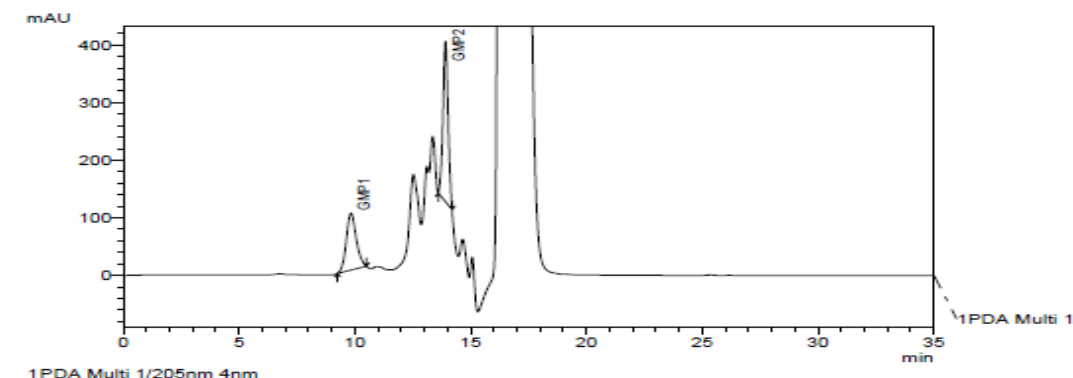
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.865	2880328	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.901	4188422	Not calculated	0.000	mg/L

Figura 19. (Continuacion).

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 15%8h-1
 Sample ID : 15%8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\15%8h-1_39.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/14 6:01:38 PM
 Modified Date : 16/04/14 6:36:40 PM

<Chromatogram>



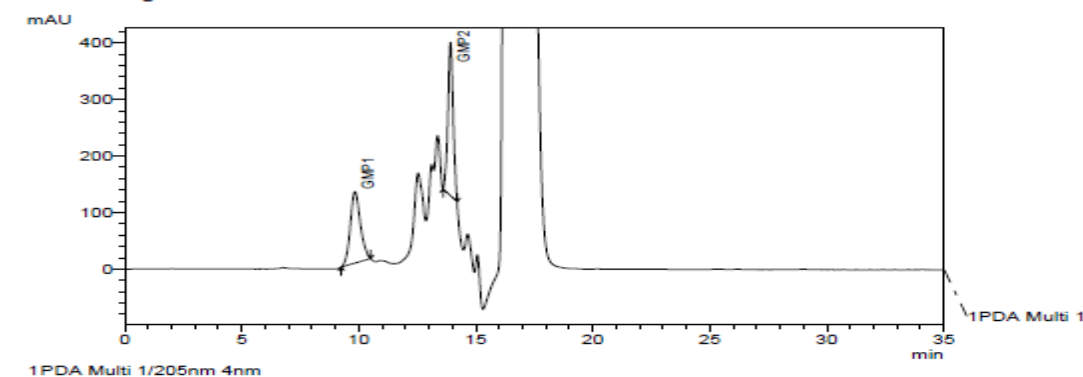
<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.828	2960336	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.905	4265112	Not calculated	0.000	mg/L

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : 20%8h-1
 Sample ID : 20%8h-1
 Operator : Ricardo Vera
 Data File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\20%8h-1_40.lcd
 Method File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcm
 Batch File Name : C:\Documents and Settings\User\Desktop\Leche\Leche.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Acquisition Date : 16/04/14 6:37:07 PM
 Modified Date : 16/04/14 7:12:10 PM

<Chromatogram>



<Results>

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Inde	Conc.	Units
1	GMP1	9.829	3793819	Not calculated	0.000	mg/L
2	GMP2	13.910	4182419	Not calculated	0.000	mg/L

ANEXO K

COTIZACIONES REACTIVOS E INSUMOS

Tabla 18. Costos totales.



Bogotá, 25 de Agosto de 2016

Señores
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
ATN. DR. RICARDO VERA BRAVO
DEPTO DE BIOLOGIA
CIUDAD

COTIZACION No. AR -0633/16

ITM	DESCRIPCION	MARCA	CANT	V/UNITARIO	V/TOTAL	IVA	ENTREGA
1	ACIDO TRICLOROACETICO FCO X KG	PANREAC	1	389.000	389.000	16	10 DIAS
2	DI-POTASIO HIDROGENOFOSFATO ANHIDRO X KG	PANREAC	1	257.000	257.000	16	10 DIAS
3	POTASIO DI-HIDROGENOFOSFATO ANHIDRO X KG	PANREAC	1	131.000	131.000	16	10 DIAS
4	SODIO SULFATO X KG	PANREAC	1	95.400	95.400	16	10 DIAS
5	TUBO P/CENTRIFUGA 50 ML ESTERIL T. FALCON PQX50	NEST	2	42.000	84.000	16	10 DIAS
6	TUBO P/CENTRIFUGA 50 ML ESTERIL FALCON PQX50	FALCON	2	55.000	110.000	16	10 DIAS
7	JERINGAS PLASTICAS 20 ML SIN AGUJA CJ X 80 UND	BD	1	43.400	43.400	16	10 DIAS
8	MEMBRANA NYLON DE 0.22 UM X 47 MM GN CJ X 100 UN	MILLIPORE	1	780.000	780.000	16	60 DIAS
9	MEMBRANA DURAPORE 0.22 UM X 47 MM GV CJ X 100 U	MILLIPORE	1	354.000	354.000	16	10 DIAS
10	FILTRO MILLEX DURAPORE ESTERIL 0,22 UM X 33 MM AMARILLOS PQ X 25 UND	MILLIPORE	1	227.700	227.700	16	10 DIAS

CONDICIONES COMERCIALES

IVA : 16% NO INCLUIDO EN EL VALOR UNITARIO

PAGO : 30 DIAS F.F.

VIGENCIA : 30 DIAS

ENTREGA : ESPECIFICADA EN CADA ITEM DESPUES DE RECIBIDA LA ORDEN SALVO VENTA PREVIA

***LAS ENTREGAS ESTAN SUJETAS A LA DISPONIBILIDAD DE LOS FABRICANTES ***

*** GUSTOSOS DE PODER SERVIRLES ***

AURA N. RAMIREZ
GERENTE

Tabla 18. (Continuacion).



Purificación y Análisis de Fluidos Ltda.
Nit. 860.518.299-1

Soluciones Tecnológicas al alcance de sus manos

COTIZACIÓN No. 150492

Oficina Principal: Bogotá Calle 93 No. 45-25
 PBX. (571) 6111805 FAX. (571) 6111835
 Agencias Cali y Medellín
 servicioalcliente@pafitda.com
 Régimen Común - www.pafitda.com

SEÑORES: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA	NIT: 860013720
DIRECCION: CR 7 40 62 OF SUMINIDTROS ED CATALUÑA	CIUDAD: BOGOTA
TELEFONO: 3208320 / 8130	FAX: 3208320
CONTACTO: Ricardo Vera Bravo	CARGO: DOCENTE

CONDICIONES COMERCIALES

FORMA DE PAGO: CREDITO 30 DIAS	FECHA EMISIÓN: 30/08/2016
TIEMPO DE DESPACHO: 30-45 DIAS RECIBIDA SU ORDEN DE COMPRA	VALIDEZ DE LA OFERTA: 15 DIAS
MONEDA DE COTIZACION: PESOS COLOMBIANOS	

Observaciones:

Para los productos ofertados que deban ser importados, la fecha registrada de despacho es nuestro mejor estimado y puede variar de acuerdo a la disponibilidad del proveedor y los tramites de importación.

ITEM	CATALOGO		DESCRIPCION					TOTAL
	CANT.	UN.MED.	VR.UNIT.	DESC. UNIT	VR.TOTAL	%IVA	VALOR IVA	
1	GNWP04700		MEMBRANAS MILLIPORE EN NYLON 0.22 MICRAS DE PORO 47 MM DE DIAMETRO, CAJA / 100					
	1.00	CAJA/100	682,112.00	34,106.00	648,006.00	16%	103,681.00	751,687.00
2	GVWP04700		FILTROS DE MEMBRANA MILLIPORE TIPO DURAPORE HIDROFILICA, 0.22 MICRAS DE TAMAÑO DE PORO, 47 mm DE DIAMETRO.					
	1.00	CAJA/100	308,928.00	15,446.00	293,482.00	16%	46,957.00	340,439.00
3	SLGV033RS		UNIDADES DE FILTRACION MILLIPORE, TIPO MILLEX. MEMBRANA DURAPORE DE 0,22 MICRAS, 33 MM DE DIAMETRO, ESTERILES.					
	1.00	CAJA/50	582,400.00	29,120.00	553,280.00	16%	88,525.00	641,805.00
TOTAL COTIZACION			1,494,768.00			239,163.00	1,733,931.00	

"APRECIADO CLIENTE:

Al elaborar su orden de compra tenga presente toda la información consignada en esta cotización para evitar inconsistencias, y no olvide citar el número de cotización en su orden. Por favor remitir su orden de compra al correo electrónico del asesor comercial PAF correspondiente".

Cuenta Corriente Bancolombia No. 042518299-07

Tabla 18. (Continuacion)

SOVIREL E.U

Fabricante - importador de material en vidrio y montaje para laboratorio.

Equipos de Física – Química – Biología – Microscopios – Balanzas.

Distribuidores de marcas Schott – Pyrex – Corning – Kimax – Boeco- Merk – Carlo Erba – Panreac.

Nit. 830.093.412-0

Bogotá, 26 Agosto de 2016

Señores:

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Atn. DR RICARDO VERA

La Ciudad.

COTIZACION

Atendiendo su amable solicitud le estoy cotizando.

Cant.	Descripción	Ref.	Vr. Unit	Vr. Total.
1	Ácido tricloacético ACS x kilo Loba chemi/ scharlau reactivo analítico	800000	\$ 379.700	\$ 379.700
1	Di-potasio hidrógeno fosfato anhidro (Hidrogeno fosfato) K2HPO4 x kilo scharlau reactivo analítico	008000	\$ 251.000	\$ 251.000
1	Potasio di-hidrogeno fosfato (Di hidrogeno fosfato) KH2PO4. ACS x kilo scharlau	000080	\$ 125.000	\$ 125.000
1	Sulfato de sodio x kilo ACS scharlau	00125	\$ 80.000	\$ 80.000
1	Membrana millipore en nylon 0.22 micras x 47 mm x 100 unidades aleman	20015	\$ 656.000	\$ 656.000
1	Membrana durapore 0.22 um x 47 mm GV caja x 100 unidades aleman	10025	\$ 350.000	\$ 350.000
1	Filtro millex durapore estéril 0.22 UM x 33 mm paquete x 25 unidades aleman	50021	\$ 224.000	\$ 224.000
4	Caja x 50 unidades tubo centrifuga graduado plástico 50 ml aleman	233801	\$ 37.700	\$ 37.700

PRECIOS COTIZADOS MAS EL 16% DEL IVA

VALIDEZ DE OFERTA: 30 DIAS

FORMA DE PAGO:35 DIAS

TIEMPO DE ENTRGA: 15DIAS HABLES SALVO VENTA PREVIA.

Jhovany Rincón

Cel.3114594018

ANEXO L

COTIZACION COLUMNA Y PRECOLUMNA

Tabla 18. (Continuación).

FORMATO COTIZACION
ACO-DCM-FR-07V2
FE:02-14.FV: 02-19
CC000235

GRUPO ALIANZA ESTRATEGICA

CL 35A SUR No. 26B 67 BOGOTA
2022632 2038752
Nit 900.101.118 - 9 Régimen Común

Suministro de Tecnología Analítica y Servicio Certificado, para la
Industria Farmacéutica, Química y de Alimentos.



COTIZACIÓN
EN PESOS
No. **GAE C-161544**

INFORMACIÓN DEL CLIENTE				FECHA
Universidad Javeriana NIT No. : 860013720-1 PAÍS COLOMBIA DIRECCION KR 7 43 82 TELEFONO : 320 8320 CIUDAD : BOGOTA				25/08/2016
INFORMACION DEL CONTACTO				
Ricardo Vera Bravo <i>Profesor</i>		ASESOR RESPONSABLE Wendy Mendoza Email DEL ASESOR wendy.mendoza@gaeltlda.com		
		CELULAR DEL ASESOR	TELEFONO OFICINA	
		317 503 0625	202 26 32	

Estimado cliente, reciba un cordial saludo. En atención a su amable solicitud, nos complace presentar la siguiente oferta de: Columna analítica HPLC

CATALOGO	OEM	DESCRIPCION	UNID	CANTIDAD	VALOR UNIT.	DCTO.	TOTAL EN PESOS
SXF888000	Shodex F8080000	Protein KW-802.5	unidad	1	US\$ 3.072.391,32	0	US\$ 3.072.391,32
Protein KW-802.5							
SXF8700181	Shodex F8700181	Protein KW-G	unidad	1	US\$ 1.233.074,47	0	US\$ 1.233.074,47
Protein KW-G							
Actividad económica 3313 y 4659 según DIAN.						PARCIAL	US\$ 4.305.465,79
						DESCUENTO	
						IVA	US\$ 688.874,53
						TOTAL EN PESOS	US\$ 4.994.340,32

----- VIGENCIA DE LA COTIZACION -----

Validez de la oferta : 5 días Forma de pago : Pago a 30 días
 Fecha en que caduca : 31/08/2016

Tiempo de entrega: 3 a 4 semanas, después de recibir orden de compra.

Nota:

- > Para facturas inferiores a \$200.000, el pago será de contado contra entrega.
- > Cotizaciones en dólares, se facturarán con la TRM del día de facturación

1- Agradecemos mencionar en su orden de compra el numero de esta cotización.

2- Nuestro grupo técnico se acogerá a sus políticas de salud, seguridad y ambiente de trabajo, esperamos su capacitación.

Su satisfacción es importante para nosotros.
Por favor, déjenos saber sus comentarios: servicioalcliente@gaeltlda.com

ANEXO M

CERTIFICACIONES CONGRESO



XIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE ALIMENTOS

Medellín 30 de Septiembre de 2016

CERTIFICADO

El XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, certifica que el trabajo; "Determinación de Lactosuero en la leche cruda, a partir de la cuantificación del glicomacropéptido de caseína por HPLC" realizado por: Ángela Hernández, Steven Peña, Ricardo Vera, Mario Rodríguez ,Elizabeth Torres y Alejandro Reyes

Se presentó para optar al ACTA 40 AÑOS, entregado en el marco del XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, llevado a cabo en Medellín del 27 de Septiembre al 30 de Septiembre de 2016.


Luz María Alzate Tamayo
Directora Académica


Ana Karina Carrascal
Secretaria Científica

**XIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA
E HIGIENE DE ALIMENTOS COLMIC 2016**

**PREMIO ACTA 40 AÑOS
2016**

El comité científico del XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos COLMIC 2016 en su reunión del día 30 de septiembre de 2016, considerando que:

1. Los estatutos vigentes contemplan la organización y otorgamiento del Premio ACTA 40 Años.
2. Con fecha 1 de abril de 2016, COLMIC realizó a través de la página web del Congreso la convocatoria a la comunidad científica y tecnológica del área para invitarles a presentar sus trabajos de investigación para concursar por el premio.
3. En seguimiento del proceso, luego de la evaluación y juzgamiento y de acuerdo con el mecanismo determinado de la adjudicación del premio, resuelve:
 - a. Otorgar el primer puesto del premio ACTA 40 Años al trabajo "Determinación de Lactosuero en la leche cruda, a partir de la cuantificación del glicomacropéptido de caseína por HPLC" realizado por Ángela Hernández Steven Peña, Ricardo Vera Mario Rodríguez, Elizabeth Torres y Alejandro Reyes.
 - b. De acuerdo con los términos de la convocatoria y de las comunicaciones establecidas con los concursantes, no se entregará el premio a los trabajos que, siendo finalistas, no se presenten en el XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos.

Se firma en la ciudad de Medellín a los 30 días del mes de Septiembre de 2016.


Luz María Alzate Tamayo
Directora Académica


Ana Karina Carrascal
Secretaria Científica



XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos

El comité organizador certifica que el trabajo titulado:

Determinación de lactosuero en la leche cruda, a partir de la cuantificación del
Glicomacropéptido de caseína por HPLC

Autores:

Ángela Hernández, Steven Peña, Ricardo Vera, Mario Rodríguez,
Elizabeth Torres, Alejandro Reyes

Fue presentado en calidad de **COMUNICACIÓN
ORAL** en el **XIII Congreso Latinoamericano de
Microbiología e Higiene de los Alimentos** realizado
en la ciudad de Medellín, Colombia, del 27 al 30 de
septiembre de 2016.



Janeth Luna Cortés
Presidenta





Luz María Alzate T.
Coordinadora Académica

En constancia se firma en la ciudad de Medellín, a los 30 días del mes de septiembre de 2016

ANEXO N

FICHAS TÉCNICAS DE REACTIVOS

Tabla 1. Fichas Técnicas de reactivos.

ÁCIDO TRICLOROACÉTICO			ICSC: 0586 Noviembre 1998
CAS: RTECS: NU: CE Índice Anexo I: CE / EINECS:	76-03-9 AJ7875000 1839 607-004-00-7 200-927-2	Ácido tricloroetanoico TCA C ₂ HCl ₃ O ₂ / CCl ₃ COOH Masa molecular: 163.4	
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	No combustible. En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.		En caso de incendio en el entorno: están permitidos todos los agentes extintores.
EXPLOSIÓN			
EXPOSICIÓN		¡EVITAR TODO CONTACTO!	¡CONSULTAR AL MÉDICO EN TODOS LOS CASOS!
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Sensación de quemazón. Dolor de cabeza. Náuseas. Vómitos. Jadeo. Dificultad respiratoria. Síntomas no inmediatos (véanse Notas).	Ventilación (no si es polvo), extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Posición de semiincorporado. Respiración artificial si estuviera indicada. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Dolor. Enrojecimiento. Ampollas. Quemaduras cutáneas.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Dolor. Enrojecimiento. Quemaduras profundas graves.	Pantalla facial o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Sensación de quemazón. Dolor abdominal. Shock o colapso.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. Dar a beber agua abundante. Reposo. Proporcionar asistencia médica. Véanse Notas.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Barrer la sustancia derramada e introducirla en un recipiente llenos de agua; si fuera necesario, humedecer el polvo para evitar su dispersión. Neutralizar cuidadosamente el residuo con bases como bicarbonato de sodio y hidróxido de sodio. Eliminarlo a continuación con agua abundante. Protección personal: traje de protección completa incluyendo equipo autónomo de respiración.		Envase irrompible; colocar el envase frágil dentro de un recipiente irrompible cerrado. Clasificación UE Símbolo: C, N R: 35-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 8 Grupo de Envasado NU: II	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-80GC4-II+III		Separado de alimentos y piensos. Véanse Peligros Químicos. Mantener en lugar fresco. Mantener en lugar seco. Bien cerrado. Mantener en lugar bien ventilado.	
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: left;"> <p>IPCS International Programme on Chemical Safety</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2005</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>			

VÉASE INFORMACIÓN IMPORTANTE AL DORSO

Tabla 1. (Continuacion).

Fichas Internacionales de Seguridad Química

ÁCIDO TRICLOROACÉTICO		ICSC: 0586
DATOS IMPORTANTES		
<p>ESTADO FÍSICO; ASPECTO Cristales incoloros e higroscópicos, de olor acre.</p> <p>PELIGROS QUÍMICOS La sustancia se descompone al calentarla intensamente, produciendo humos tóxicos y corrosivos, incluyendo cloruro de hidrógeno y cloroformo. La disolución en agua es un ácido fuerte, reacciona violentamente con bases y es corrosiva para muchos metales.</p> <p>LÍMITES DE EXPOSICIÓN TLV: 1 ppm (como TWA), A3 (ACGIH 2005). MAK: 1lb (no establecido pero hay datos disponibles) (DFG 2005).</p>	<p>VÍAS DE EXPOSICIÓN La sustancia se puede absorber por inhalación del vapor y por ingestión.</p> <p>RIESGO DE INHALACIÓN Por evaporación de esta sustancia a 20°C se puede alcanzar bastante lentamente una concentración nociva en el aire.</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN La sustancia es corrosiva para los ojos, la piel y el tracto respiratorio. Corrosivo por ingestión. La inhalación del vapor puede originar edema pulmonar (véanse Notas). Los efectos pueden aparecer de forma no inmediata. Se recomienda vigilancia médica.</p>	
PROPIEDADES FÍSICAS		
<p>Punto de ebullición: 198°C Punto de fusión: 58°C Densidad: 1.6 g/cm³</p> <p>Solubilidad en agua: muy elevada Presión de vapor, Pa a 51°C: 133 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 5.6</p>	<p>Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 1.7</p>	
DATOS AMBIENTALES		
NOTAS		
<p>Los síntomas del edema pulmonar no se ponen de manifiesto, a menudo, hasta pasadas algunas horas y se agravan por el esfuerzo físico. Reposo y vigilancia médica son, por ello, imprescindibles. Debe considerarse la inmediata administración de un aerosol adecuado por un médico o persona por él autorizada. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en octubre de 2005: ver Límites de exposición, Clasificación UE, Respuesta de Emergencia</p>		
INFORMACIÓN ADICIONAL		
<p>Límites de exposición profesional (INSHT 2011): VLA-ED: 1 ppm; 6,8 mg/m³</p>		
NOTA LEGAL	<p>Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.</p>	
© IPCS, CE 2005		

Tabla 1. (Continuacion).



HOJA DE SEGURIDAD

FOSFATO DIPOTASICO (Grado Alimenticio)

Sección II IDENTIFICACION DEL PRODUCTO	
Nombre comercial:	Fosfato de Potasio Dibásico
Nombre químico:	Fosfato de Potasio Dibásico
Sinónimos:	Fosfato de Potasio Dibásico, Mono hidrógeno Ortofosfato, DKP, Sal di potásica.
Familia Química:	Sal inorgánica
CAS N°:	7758-11-4
Peso Molecular:	174.18
Fórmula Química:	K_2HPO_4

Sección II RIESGOS FISICOS			
Producto NO inflamable NO tóxico Por su carácter alcalino es ligeramente irritante.		GRADO DE RIESGO: 4= EXTREMO 3= ALTO 2= MODERADO 1= LEVE 0= INSIGNIFICANTE	
Salud	1	Azul	Ligero
Inflamabilidad	0	Rojo	Ninguna
Reactividad	0	Amarillo	Ninguna
Especial	0	Especial	Ninguna

DATOS DE REACTIVIDAD

1. Sustancia Estable (X)	Inestable
2. Polimerización peligrosa: Puede ocurrir	No puede ocurrir (X)
3. Condiciones a evitar :	Materiales incompatibles
4. Incompatibilidad (Sustancias a evitar):	Puede reaccionar con ácidos fuertes.

Sección IV RIESGOS PARA LA SALUD	
Contacto con la piel:	No produce irritación (en periodos cortos de exposición).
Contacto con ojos:	Ligera irritación
Inhalación:	Ligera irritación
Ingestión:	Irritación

Tabla 1. (Continuacion).



Sección V PROCEDIMIENTOS DE PRIMEROS AUXILIOS

VÍAS DE ENTRADA	SINTOMAS DE LESIONADO	PRIMEROS AUXILIOS
1.- Ingestión accidental	Grandes dosis puede provocar trastornos gastrointestinales	Debe beber inmediatamente agua ò leche. Nunca de nada por la boca a una persona que este inconsciente. Solicitar asistencia medica de inmediato.
2.-Contacto con los ojos	Irritación y ardor en los ojos	Lavar suavemente con agua corriente durante 15 minutos, abriendo ocasionalmente los parpados. Solicitar atención medica de inmediato.
1.- Ingestión accidental	Ligera irritación	Lavar suavemente con agua corriente durante 15 minutos, al mismo tiempo quitarse la ropa contaminada y calzado. Solicite atención médica.
4.-Absorción 5.-inhalación	No identificado Irritación en las vías tracto respiratorias	No se dispone de información Traslade a un lugar con ventilación adecuada.

Sección VI PROTECCION PERSONAL

Ojos: Se recomienda el uso de lentes de seguridad

Piel: Se recomienda el uso de guantes de neopreno, botas de hule y guantes de neopreno y pechera de vinilo, mascarillas con cartuchos para vapores ácidos ó bien utilizar equipo autónomo.

Condiciones de Trabajo: Áreas ventiladas

Practicas de Higiene: Después de estar en contacto con este producto lavar con agua y jabón todo su equipo de seguridad.

Bañarse y lavar su uniforme para evitar que este contaminada con residuos del producto.

Sección VII MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Se debe almacenar y/o transportar por compatibilidad.

Debe de estar debidamente etiquetado, la cual debe de contener: nombre del material y color de almacenaje, junto con las indicaciones de primeros auxilios.

Se recomienda almacenar el producto en áreas frescas y ventiladas, evitar el contacto del material con agua y atmósferas con exceso de humedad. Cerrar los sacos inmediatamente si ya no se va utilizar el material.

Residuos del producto pueden permanecer en el recipiente "vacío". Para el manejo de los recipientes vacíos y residuos se deben de tomar las mismas precauciones que en el manejo del producto.

Limpiar antes de volver a usar o alterar el contenido de un envase.

Sección VIII PROCESO DE DISPOSICION DE RESIDUOS

Proceder de acuerdo a la reglamentación local, estatal y federal.

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 1 de 6
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄)		

1. IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA O PREPARADO Y DE LA EMPRESA

Nombre Comercial	: Fosfato de Potasio monobásico
Sinónimos	: Fosfato monopotásico, dihidrogenofosfato de potasio, PDK.
Formula Química	: KH ₂ PO ₄
Peso Molecular	: 136.086 g/mol
Uso	: se utiliza como un fertilizante , un aditivo alimentario y un fungicida . También es un agente amortiguador.
Identificación de la Empresa	: Pontificia Universidad Javeriana www.javerianacali.edu.co
Número Telefónico	: PBX. (572) 321 8200 – 711: Emergencias Médicas 555: Servicios Generales


2. IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS

Identificación de Riesgos	PRECAUCIÓN! Puede causar irritación a la piel, ojos y vías respiratorias. Puede ser nocivo si se ingiere o se inhala.
Síntomas relacionados con la exposición	
- Inhalación	: Puede causar una ligera irritación de las vías respiratorias.
- Contacto con los ojos	: Puede causar irritación, enrojecimiento y dolor.
- Contacto con la piel	: Debido a su naturaleza ácida irritativa, puede causar inflamación y dolor al contacto prolongado, especialmente con la piel húmeda.
- Ingestión	: Los fosfatos son absorbidos lenta e incompletamente cuando se ingiere, y rara vez resultan en efectos sistémicos. Estos efectos, sin embargo, se han producido síntomas que pueden incluir vómito, letargo, diarrea, efectos químicos de sangre, efectos sobre el corazón y sistema nervioso central. La toxicidad de los fosfatos se debe a su capacidad de secuestrar el calcio. La intoxicación de potasio puede resultar en efectos corazón, cambios en la frecuencia respiratoria, sensación de hormigueo en las extremidades, sensación de pesadez en las extremidades, náuseas y diarrea.

3. COMPOSICIÓN / INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Nombre del Componente	Porcentaje	C.A.S
Fosfato Monobásico de Potasio	99.0-100%	7778-77-0

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 2 de 6
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄)		

4. PRIMEROS AUXILIOS

Primeros Auxilios	
- Inhalación	: Remover al aire fresco. Si no respira, dar respiración artificial. Si se le dificulta respirar, dar oxígeno.
- Contacto con los ojos	: En caso de contacto inmediatamente lavar con abundante agua por lo menos 15 minutos, abriendo y cerrando los párpados ocasionalmente. Llamar a un médico si irritación persiste.
-Contacto con la piel	: Lavar piel con abundante agua y jabón mientras se remueve la ropa contaminada. Conseguir atención médica si irritación persiste o se desarrolla.
-Ingestión	: En caso de ingestión, dar varios vasos de agua para beber para diluir. Si se ingieren grandes cantidades o si se presentan síntomas, busque ayuda médica. No dar nada por boca a una persona inconsciente.


5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

Tipo de inflamabilidad	: No inflamable
Productos peligrosos de la combustión	: Oxidos de Fósforo y Oxido de Potasio.
Prevención	: -
Medios de extinción de incendios	: Utilización de extintores apropiados al fuego circundante. En general, uso de agentes de Anhídrido Carbónico y/o Polvo Químico Seco. Aplicación de Agua sólo en forma de neblina
Protección en caso de incendio	: Protección de la piel observando una distancia de seguridad, y usando ropa protectora adecuada.
Riesgos específicos	: No Combustible

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

Precauciones generales	: Use las herramientas apropiadas para colocar el material derramado en un recipiente adecuado para disposición de desechos.
-------------------------------	--

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 3 de 6
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄)		

Métodos de Limpieza	<p>Junte el material derramado en un beaker grande y disuélvalo con agua. Vierta los materiales derramados por el desagüe con un amplio exceso de agua. Descontamine el área del derrame con una solución jabonosa.</p>
Precauciones para el medio ambiente	<p>Evite que el material derramado salga al ambiente exterior. Evacúe lo necesario para la limpieza del derrame. Si las condiciones lo ameritan, aumente el área de evacuación.</p>

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

General	
Medidas de protección técnicas	
Almacenamiento	<p>: Proteja de: calor humedad Almacenar separadamente de condiciones y productos incompatibles. Proteger contra el daño físico. Mantener los envases cerrados y debidamente etiquetados</p>
Manipulación	<p>: No coma, no beba, no fume mientras manipule este producto. Evite el contacto con ojos piel; No respire el polvo. Lávese bien después de su manipulación. Observe las prácticas generales de higiene industrial al usar este producto.</p>

8. CONTROLES DE LA EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN PERSONAL



Protección personal	
- Protección de las vías respiratorias	: Ventilación y/o protección respiratoria.
- Protección de las manos y cuerpo	: Guantes de látex desechables, bata de laboratorio
- Protección para la piel	: Utilizar ropa de trabajo adecuada que evite el contacto del producto
- Protección para los ojos	: Gafas químicas o gafas de seguridad. Mantener una ducha de emergencia visible y de fácil acceso al área de trabajo.
- Ingestión	: No comer, no beber y no fumar durante el trabajo.
- Medidas de higiene particulares	: sustituir la ropa contaminada y sumergir en agua. Lavar las manos al termino del trabajo
- Control de exposición	:
- Parámetros de Exposición	:

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 4 de 6
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄)		


-TLV-TWA (ppm) (mgr/m3):	: N.D.
-TLV-STEL (ppm) (mgr/m3):	: N.D.
-TLV-C (ppm):	: N.D.

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	
Estado físico a 20°C	: Sólido
Color	: Polvo blanco
Olor	: Inodoro
Punto de fusión [°C]	: 252,6 ° C
Punto de ebullición [°C]	: 400 ° C
pH	: Solución 5% = 8,00
Presión de vapor, 20°C	: N. A.
Densidad	: 2.338 g/cm ³
Solubilidad en agua	: 22 g/100 ml (25 ° C)
Limites de explosión - Inferior [%]	: N.A.
Limites de explosión - Superior [%]	: N.A.
Peso molecular	: 136,086 g / mol

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD	
Estabilidad y reactividad	: Estable e condiciones normales de manipulación y almacenamiento.
Productos de descomposición	: Humos tóxicos de: óxidos de fósforo óxidos de sodio óxido de potasio
Incompatibilidades :	: Ácidos fuertes, como el Acido Sulfúrico (reacción violenta). Bases fuertes, como el Sodio Hidróxido (reacción violenta). Agentes Oxidantes fuertes
Condiciones a evitar	: Temperaturas extremosas Humedad excesiva

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA	
Toxicidad	La inhalación del polvo y el contacto con la piel o los ojos puede causar irritación. La ingestión puede causar efectos adversos sobre la salud.
Sensibilidad al producto	
Efectos locales	Este material puede irritar piel y ojos.

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 5 de 6
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄)		

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

Información sobre efectos ecológicos	Evite la contaminación de alcantarillas y cursos de agua. No se esperan productos de degradación peligrosos a corto plazo. Sin embargo, pueden formarse productos de degradación a largo plazo. Ni el producto en si ni sus productos de degradación son tóxicos.
---	---

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

General	Lo que no se pueda conservar para recuperación o reciclaje debe ser manejado en una instalación de eliminación de residuos adecuadas y aprobadas. El procesamiento, utilización o contaminación de este producto puede cambiar las opciones de gestión de residuos. Deseche el envase y el contenido no utilizado de conformidad con los requisitos Estatales.
----------------	--

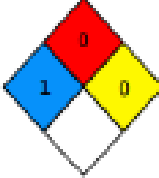
14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

Transporte terrestre (ADR/TPC - RID/ TPF)	No está clasificado como mercancía peligrosa
- Denominación para el transporte	FOSFORO DE POTASIO MONOBÁSICO
- N° ONU	
- N° Riesgo	
- ADR - Clase	
- Etiquetado según ADR	
- ADR - División	
- ADR - Grupo	
- Cantidad limitada ADR	
Transporte marítimo (IMDG)	
- Denominación para el transporte	
- N° ONU	
- IMO-IMDG - Clase	
- IMO-IMDG - Etiqueta	
- IMO-IMDG - Grupo	
- EmS N°	

Tabla 1. (Continuacion).

 Pontificia Universidad JAVERIANA <small>-Col-</small>	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 6 de 6
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄)		

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA


-Símbolos -Clasificación según la norma NFPA 704	 Peligro a la salud = 1; Peligro de Inflamabilidad = 0; Peligro de Reactividad = 0.
---	---

16. OTRA INFORMACIÓN

Información adicional	: Ninguno/a.
------------------------------	--------------

Fin del Documento

Tabla 1. (Continuación).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 1 de 7
		SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)

1. IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA O PREPARADO Y DE LA EMPRESA

Nombre Comercial	: Sulfato de Sodio
Sinónimos	: Sulfato disodio, sal disodio, Sulfato sódico
Formula Química	: (Na ₂ SO ₄)
Peso Molecular	: 142.04 g/mol
Uso	: Utilizado como desecante en el laboratorio o la industria química. Se utiliza en la fabricación de la celulosa y como aditivo en la fabricación del vidrio.
Identificación de la Empresa	: Pontificia Universidad Javeriana www.javerianacali.edu.co
Número Telefónico	: PBX. (572) 321 8200 – 711: Emergencias Médicas 555: Servicios Generales


2. IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS

Identificación de Riesgos	: CRISTALES BLANCOS, INODORO. Este producto puede causar leve irritación al ser inhalado, ingerido, y por contacto con la piel y ojos. Su principal efecto es diarreico, cuando es ingerido. La sustancia se descompone por sobrecalentamiento formando gas tóxico (Dióxido de Azufre).
Síntomas relacionados con la exposición	
- Inhalación	: Irritación. No se espera que sea peligroso para la salud.
- Contacto con los ojos	: Puede causar irritación.
- Contacto con la piel	: Irritación. No se esperan efectos adversos.
- Ingestión	: Diarrea. Levemente tóxico.

3. COMPOSICIÓN / INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Nombre del Componente	Porcentaje % Molar	C.A.S
Sulfato de Sodio	99% min.	7757-82-6

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 2 de 7
SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)		

4. PRIMEROS AUXILIOS

Primeros Auxilios	
- Inhalación	: Aire fresco, descanso, posición semirecta y enviarlo a la clínica hasta que recupere su respiración.
- Contacto con los ojos	: Lavar los ojos con suficiente agua por lo menos 15 minutos. Avisar al médico si se desarrolla la irritación.
- Contacto con la piel	: Quitar la ropa afectada, lavar la piel con suficiente agua y jabón (ducha) y poner ropa seca. Llamar al médico si se desarrolla la irritación.
- Ingestión	: Lavar la boca, dar suficiente agua para beber e inducir el vómito. Si grandes cantidades son absorbidas llamar al médico.


5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

Tipo de inflamabilidad	: No inflamable
Productos peligrosos de la combustión	: N.A.
Prevención	: No fumar. Acatar las indicaciones.
Medios de extinción de incendios	: Use cualquier medio apropiado para extinguir el fuego.
Fuegos vecinos	: N. A.
Protección en caso de incendio	: Sin riesgo de incendio. Pueden ocurrir explosiones violentas en caso de que el sulfato de sodio se funda con aluminio
Riesgos específicos	: No Combustible

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

Precauciones generales	: Procurar una buena ventilación, portando la ropa de protección personal reglamentaria.
Métodos de Limpieza	Ventilar el área de derrame o escape. Usar el equipo y personal adecuado. Recoger el derrame y contenerlo para posterior disposición. Cuando se vaya a limpiar el área de derrame o escape, humedecer el área para evitar dispersar el polvo.

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 3 de 7
SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)		

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

General	
Medidas de protección técnicas	:
Almacenamiento	: Los contenedores deben permanecer altamente sellados en un área fría, seca y ventilada. Proteger contra daño físico, despejar de sustancias incompatibles. Contenedores de aluminio puede ser peligroso cuando están vacíos, puesto que, retienen residuos de productos (polvo, sólidos); observar toda precaución y advertencia listada para este producto.
Almacenamiento - lejos de	: Mantener alejado de contenedores de aluminio.
Manipulación	: Lavar las manos antes de comer. Quitar y lavar la ropa contaminadas antes de la reutilización. Reducir al mínimo la generación y acumulación del polvo. Evitar el contacto con los ojos, la piel, y la ropa.

8. CONTROLES DE LA EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN PERSONAL



Protección personal	
- Protección de las vías respiratorias	: Ventilación o protección respiratoria (respirador). Si la atmosfera está deficiente de oxígeno, los respiradores podrían no proteger al personal.
- Protección de las manos y cuerpo	: Guantes de goma o plástico, largos de seguridad, Bata de laboratorio.
- Protección para la piel	: Utilizar ropa de trabajo adecuada que evite el contacto del producto.
- Protección para los ojos	: Gafas químicas o gafas de seguridad. Mantener una ducha de emergencia visible y de fácil acceso al área de trabajo.
- Ingestión	: No comer, no beber y no fumar durante el trabajo.
-Medidas de higiene particulares	: sustituir la ropa contaminada y sumergir en agua. Lavar las manos al termino del trabajo
- Control de exposición	:
-Parámetros de Exposición	

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 4 de 7
SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)		

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

-Estado físico a 20°C	: Cristales o polvos blancos
-Color	: Blanco
-Olor	: Inodoro
-pH	: 4.9 (solucion del 5%)
-Punto de fusión [°C]	: 884 ° C (anhidro) 32,4 ° C (decahidrato)
-Punto de ebullición [°C]	: 1429 ° C (anhidro)
-Presión de vapor, 20°C	: N. A.
-Densidad relativa al agua	: 2,664 g / cm ³ (anhidro) 1,464 g / cm ³ (decahidrato)
-Solubilidad en agua	: 4,76 g/100 ml (0 ° C) : 42,7 g/100 ml (100 ° C) Insoluble en Etanol
-Límites de explosión - Inferior [%]	: N.A.
-Límites de explosión - Superior [%]	: N.A.
-Peso molecular	: 142.04 g/mol


10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad	: Estable en contenedores altamente sellados, bajo condiciones normales de uso y almacenamiento (temperatura y presión ambiente).
Reactividad -Productos de descomposición	: Polimerización peligrosa: Ninguna Productos peligrosos de descomposición: Óxidos de azufre, humos irritantes y tóxicos y gases, óxido del sodio.
Incompatibilidades :	: Oxidantes fuertes, aluminio, magnesio, potasio, mercurio, plomo, calcio, plata, bario, iones del amonio, estroncio. En combinación con sulfato de sodio, aluminio y magnesio estallará a 800° C.
Condiciones a evitar	: Materiales incompatibles, generación del polvo, humedad, exceso de calor.

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

LD 50 ORAL (ratón)	: 5989 mg/kg
LD 50 INTRAVENOSA (conejos)	: 1220 mg/kg
Efectos crónicos	: No listado por ACGIH, IARC, NIOSH, el NTP, o el OSHA

Tabla 1. (Continuacion).

	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 5 de 7
SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)		

Observaciones especiales sobre otros efectos tóxicos en el hombre	: La piel: Puede causar irritación, aunque no se sabe que es un irritante. Ojos: Puede causar irritación ocular. Ingestión: catárticos salinos son mal absorbidos por el tracto gastrointestinal, por lo tanto, la toxicidad sistémica
--	--

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

Información sobre efectos ecológicos	: No se espera que este producto químico cause el agotamiento del oxígeno en sistemas acuáticos. Tiene un potencial bajo de afectar organismos acuáticos y se espera que tenga un potencial bajo de afectar microorganismos secundarios del tratamiento inútil. Ambiental: El sulfato de sodio puede persistir indefinidamente en el ambiente, pero no es probable demostrar efectos de la bioacumulación o de la contaminación de la cadena de alimento. Si está diluido con agua, no se espera que este producto químico lanzado directamente o indirectamente en el ambiente tenga un impacto significativo .
Toxicidad en peces (LC50):	:12750 ppm (96 h)
Toxicidad daphnia (LC50):	:4547 mg/L (96 h)


13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

General	: Los residuos deben eliminarse de acuerdo con las autoridades federales, estatales y locales del medio ambiente con sus respectivos reglamentos de control.
----------------	--

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

Transporte terrestre (ADR/TPC - RID/TPF)	N.A. Sustancia Estable. No está clasificado como mercancía peligrosa
- Denominación para el transporte	SULFATO DE SODIO
- N° ONU	
- N° Riesgo	
- ADR - Clase	
- Etiquetado según ADR	
- ADR - División	
- ADR - Grupo	

Tabla 1. (Continuacion).

	<p style="text-align: center;">FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD</p>	Página 6 de 7
SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)		

Transporte marítimo (IMDG) - Denominación para el transporte - N° ONU - IMO-IMDG - Clase - IMO-IMDG - Etiqueta - IMO-IMDG - Grupo - EmS N° - IMDG - Polución marina	
Transporte aéreo (ICAO-IATA) - Denominación para el transporte - N° ONU - IATA - Clase - IATA - Grupo	

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA





Símbolos - Clasificación según la norma NFPA 704	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>IRRITANTE (Xi).+</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <p>Peligro a la salud = 1; Peligro de Inflamabilidad = 0; Peligro de Reactividad = 0.</p> <p>- Frases S S-02: Manténgase fuera del alcance de los niños. S-22: No respirar el polvo. S-26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S-46: En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrela la etiqueta o el envase.</p>
--	---

Tabla 1. (Continuación).

 Pontificia Universidad JAVERIANA Cali	FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD	Página 7 de 7
SULFATO DE SODIO (Na₂SO₄)		
16. OTRA INFORMACIÓN		
Información adicional	: Ninguno/a.	

Fin del Documento


 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Agosto - 2016

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Nosotros Angela Viviana Hernandez Cordon y Cesar Steven Peña Monroy en calidad de titulares de la obra **Propuesta para el control de la adulteración en leche cruda con la adición de lactosuero por medio de una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en Alquería**, elaborada en el año 2015, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad de América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).


Al respecto como Autores manifestamos conocer que:


- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad de América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.


 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Agosto - 2016

- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **Licencia Creative Commons** que se señala a continuación:


Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.


Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.


Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D. C., a los ocho días del mes de noviembre del año 2016.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Angela Viviana	Hernández Cordón
Documento de Identificación No.	Firma
1.072.662.197 de Chía	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Cesar Steven	Peña Monroy
Documento de Identificación No.	Firma
1.026.278.151 de Bogotá	