

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES**

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE
QUÍMICA”**

TEMA:

<VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANÁLITICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ACIDEZ EN LECHE>

AUTOR:

<ANTHONY NIETO MOLINA>

Guayaquil - Ecuador

<<2022>

RESUMEN

La leche es un alimento consumido a nivel general y está presente en la pirámide de alimentación de cualquier ser humano, por brindarnos macro y micronutrientes esenciales para el organismo.

Sin embargo, esta clase de productos requieren ser controlados por las Agencias Reguladoras de cada país, para determinar la calidad del producto. Uno de estos parámetros para determinar la calidad, es la acidez titulable, la cual nos sirve para verificar las condiciones higiénicas en la cual el producto fue sometido hasta llegar al producto final.

Se obtuvo resultados satisfactorios en la validación de la metodología de acidez titulable en las matrices de Leche UHT, en los tipos Entera, Semidescremada y Descremada, cumpliendo con los objetivos propuestos en el presente trabajo, a su vez cumpliendo con las Normativas Vigentes Ecuatorianas.

ABSTRACT

Milk is a food consumed at a general level and is present in the food pyramid of any human being, because it provides us with essential macro and micronutrients for the body.

However, this kind of products need to be controlled by the Regulatory Agencies of each country, to determine the quality of the product. One of these parameters to determine the quality is the titratable acidity, which helps us to verify the hygienic conditions in which the product was subjected until reaching the final product.

Satisfactory results were obtained in the validation of the titratable acidity methodology in the UHT Milk matrices, in the Whole, Semi-skimmed and Skimmed types, complying with the objectives proposed in this work, in turn complying with the Ecuadorian Current Regulations.

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado para las personas que cooperaron y coadyuvaron desde los inicios de mi vida para alcanzar a finalizar este proyecto, eternamente agradecidos por toda la constancia, oportunidades brindadas para finalizar este gran paso.

AGRADECIMIENTO

Un sincero agradecimiento a los docentes y tutora de la Maestría por su valioso aporte para el crecimiento estudiantil y personal.

Agradecimiento a los compañeros de las áreas en las que se elaboró los análisis y se ejecutó el procesamiento de la data obtenida en los estudios realizados en la Dirección Técnica de Laboratorio de Referencia de la ARCSA.

Gratitud especial a las personas que son complacientes hacia mi persona, dar los agradecimientos por su apoyo incondicional.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

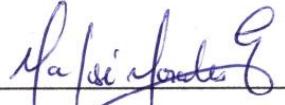


Anthony Alejandro Nieto Molina

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Dr. Joel Eduardo Vielma Puente
PRESIDENTE



MSc. María José Morales Estupiñán
TUTOR



MSc. Nadia Magaly Flores Manrique
DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

ANL 1: Analista Uno

ANL 2: Analista Dos

AOAC: Official Methods of Analysis

CO₂: Dióxido de Carbono

Cp: Centipoise

FAO: Food and Agriculture Organization

g: Gramos

H⁺: Ion Hidrogeno

H₂O: Agua

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

NaOH: Hidróxido de Sodio

NTE/INEN: Norma Técnica Ecuatoriana/ Servicio Ecuatoriano de Normalización.

OMS: Organización Mundial de la Salud

pH: Potencial de Hidrógeno

Sr: Desviación estándar por repetibilidad

SR: Desviación estándar por reproducibilidad

UHT: Ultra High Temperature

USD: Dolar Americano

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
DECLARACIÓN EXPRESA	V
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	VI
ABREVIATURAS O SIGLAS	VII
TABLA DE CONTENIDO.....	VIII
LISTADO DE FIGURAS.....	XI
LISTADO DE TABLAS	XII
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Antecedentes</i>	1
1.2. <i>Descripción del problema</i>	3
1.3. <i>Objetivos</i>	4
1.3.1. Objetivo General.	4
1.3.2. Objetivo Específicos.	4
1.4. <i>Hipótesis</i>	5
1.5. <i>Alcance</i>	6
CAPÍTULO 2.	7
MARCO TEÓRICO	7
2. LECHE.	7
2.1. <i>Definición.</i>	7
2.2. <i>Tipos de leche</i>	7
2.2.1. Larga Vida.....	7
2.2.2. Leche Cruda.....	8
2.2.3. Leche Pasteurizada.....	8
2.2.4. Leche Homogenizada	8
2.2.5. Leche Termizada	8
2.3. <i>Clasificación de leche larga vida</i>	9
2.3.1. Leche Entera.....	9

2.3.2.	Leche Descremada	9
2.3.3.	Leche Semidescremada	9
2.3.4.	Leche Deslactosada	10
2.4.	<i>Composición de la leche</i>	10
2.4.1.	Proteínas	10
2.4.2.	Materia grasa	11
2.4.3.	Hidratos de Carbono	11
2.4.4.	Salas minerales	12
2.4.5.	Enzimas.	13
2.4.6.	Vitaminas Hidrosolubles.....	13
2.5.	<i>Características organolépticas de la leche</i>	13
2.5.1.	Textura	13
2.5.2.	Color	13
2.5.3.	Sabor	14
2.5.4.	Olor	14
2.6.	<i>Ordeño</i>	14
2.6.1.	Ordeño Manual	14
2.6.2.	Ordeño Mecánico.....	15
2.7.	<i>Transporte de leche</i>	15
2.8.	<i>Acidez titulable</i>	16
2.9.	<i>Ácido láctico</i>	17
2.10.	<i>Validación</i>	18
2.11.	<i>Precisión</i>	19
2.11.1.	Repetibilidad	19
2.11.2.	Reproducibilidad	20
2.11.3.	Robustez	20
2.11.4.	Exactitud	20
CAPÍTULO 3		22
3.	METODOLOGÍA	22
3.1.	<i>Diseño de la Investigación</i>	22
3.2.	<i>Población</i>	22
3.3.	<i>Muestra</i>	23
3.4.	<i>Métodos y Materiales</i>	23
3.4.1.	Metodología.....	23
3.5.	<i>Validación de Método</i>	25
3.5.1.	Incertidumbre Combinada.	26
3.5.2.	Incertidumbre Expandida	26
3.5.3.	Factor de Cobertura (k)	26
3.5.4.	Repetibilidad y Reproducibilidad	26
3.5.5.	Exactitud:	27

CAPÍTULO 4	28
4. RESULTADOS	28
4.1. <i>Reporte de resultados</i>	28
4.1.1. Estandarización de la Hidróxido de Sodio 0.1N.	28
4.1.2. Data primaria de acidez en leche entera.	30
4.1.3. Data primaria de acidez en leche semidescremada.	31
4.1.4. Data primaria de acidez en leche descremada.	32
4.1.5. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad en leche entera.	33
4.1.6. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad en leche semidescremada.	35
4.1.7. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad en leche descremada.	37
4.1.8. Incertidumbre de equipo e instrumento de medición.	39
4.1.9. Exactitud.	42
4.1.10. Incertidumbre Combinada.	43
4.1.11. Robustez	46
CAPÍTULO 5	51
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	51
5.1. <i>Conclusiones</i>	51
5.2. <i>Recomendaciones</i>	53
CAPITULO 6	54
6. REFERENCIAS	54
CAPÍTULO 7	60
7. APÉNDICES Y ANEXOS	60

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2-1 Miscela de la Caseína de la Leche	11
Figura 2-2 Reacciones de la Acidez en Leche	17
Figura 4-1 Reacción Química del Ácido Láctico frente al Hidróxido de Sodio.	29
Figura 4-2 Factores de Incertidumbre Combinada Leche Entera.....	44
Figura 4-3 Factores de la incertidumbre combinada	45
Figura 4-4 Factores de la incertidumbre combinada Leche Descremada	46
Figura 4-5 Masa de Muestra vs Concentración de Acidez.	48
Figura 4-6 Cantidad de Agua vs Concentración de Acidez.	49
Figura 4-7 Fenolftaleína vs Concentración de Acidez.	49
Figura 4-8 Temperatura vs Concentración de Acidez.	50

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2-1 Composición de la leche (x 100g de leche)	10
Tabla 2-2 Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.....	18
Tabla 3-1 Materiales a Utilizar para la Acidez Titulable	23
Tabla 3-2 Matriz y Puntos Utilizados.....	25
Tabla 3-3 Repetibilidad y Reproducibilidad.....	26
Tabla 4-1 Normalidad del Hidróxido de Sodio Estandarizado	30
Tabla 4-2 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Entera ANL 1	30
Tabla 4-3 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Entera ANL 2.....	30
Tabla 4-4 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Semidescremada ANL 1.	31
Tabla 4-5 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Semidescremada ANL 2.	31
Tabla 4-6 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Descremada ANL 1.	32
Tabla 4-7 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Descremada ANL 2.	32
Tabla 4-8 Data de Acidez en Leche Entera Mt.1.....	34
Tabla 4-9 ANOVA de data de Acidez en Leche Entera Mt.1.....	34
Tabla 4-10 Incertidumbre de Repetibilidad y Reproducibilidad en Leche Entera. .	35
Tabla 4-11 Data de Acidez en Leche Semidescremada Mt.2	36
Tabla 4-12 ANOVA de data de Acidez en Leche Semidescremada Mt.2	36
Tabla 4-13 Incertidumbre de Repetibilidad y Reproducibilidad en Leche Semidescremada.....	37
Tabla 4-14 Data de Acidez en Leche Descremada Mt.3.....	38
Tabla 4-15 ANOVA de data de Acidez en Leche Descremada Mt.3.....	39
Tabla 4-16 Incertidumbre de Repetibilidad y Reproducibilidad en Leche Descremada.....	39
Tabla 4-17 Incertidumbre de la Exactitud (Recuperación) en Prueba Interlaboratorio.....	42
Tabla 4-18 Incertidumbre combinada Matriz Leche Entera.....	43
Tabla 4-19 Incertidumbre combinada Matriz Leche Semidescremada	44
Tabla 4-20 Incertidumbre combinada Matriz Leche Descremada	45
Tabla 4-21 Condiciones y parámetros para el análisis de Acidez Titulable.	46
Tabla 4-22 Variabilidad de procedimiento para Robustez.....	47

Tabla 4-23 Resultados con modificaciones para verificar robustez.47

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Desde el punto de vista nutricional, la leche de vaca contribuye con el desarrollo humano en virtud de su contenido de nutrientes como grasa, proteína, lactosa, vitaminas y minerales, pues bien, poseen cierta similitud a la leche materna la cual es de vital importancia durante el crecimiento y desarrollo de los seres humanos desde la génesis de nuestra subsistencia. [1]

La leche es uno de los alimentos más importantes en la nutrición humana (por no decir el más importante), desde el principio de nuestra vida consumimos por primera vez la leche materna, es el primer vector natural de nutrientes durante la vida de cualquier ser humano, en la cual, es de vital importancia garantizar su consumo y conservación.

En la actualidad el mercado busca garantizar productos de calidad e inocuos, que muestren un alto valor nutricional y por ende se consideren como un componente importante de la dieta de los seres humanos; en este sentido la leche cruda. [2]

Estos forman parte de una dieta saludable y balanceada, ya que contienen micro y macronutrientes y una mayor disponibilidad, porque contienen microorganismos que favorecen al microbiota intestinal, los cuales actúan desplazando a los patógenos y también intervienen en los mecanismos de inmunomodulación, por lo que su consumo debe realizarse desde los primeros años de vida.

La leche y los productos lácteos tienen un papel importante en la dieta humana debido a sus numerosos nutrientes beneficiosos, como proteínas, azúcares, minerales y vitaminas solubles en agua. [3]

Por ende, al ser un alimento consumido en su gran mayoría de los habitantes, existe una gran demanda de productos provenientes de la leche, por lo cual grandes empresas ven un potencial económico e industrial para la fabricación y comercialización de leches, existiendo una gran variedad de productos en el mercado.

Para esto se necesita que se controle satisfactoriamente los parámetros intrínsecos, dentro de los cuales se encuentra la acidez de la leche, la cual es muy importante para la determinar frescura y el estado de conservación del

producto, asimismo, también se puede observar la alteración de la leche detectada por la acidificación.

Con esto, se determina la calidad del producto que se comercializa en el mercado ecuatoriano, para cumplir los estándares establecidos por la Norma INEN, para su distribución a los consumidores.

1.2. Descripción del problema

De acuerdo con el INEC, en el año 2020 se producen diariamente 6,152.841 litros de leche cruda, la cual, representa fuente de ingresos económicos para aproximadamente a 1,2 millones de personas en territorio nacional. Esto equivale un consumo de leche por habitante dentro de Ecuador sea de 110 litros cada año. Aun así, representa una minoría con lo que recomienda las FAO Y OMS para el consumo anual por persona (unos 180 litros aproximadamente por habitante cada año). [4]

Según los datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), la zona industrial láctea de la nación produce alrededor de 1.400 millones USD al año por la producción e industrialización de la leche y el precio oficial del litro de leche al productor es de 0,42 USD.

En la mencionada zona industrial láctea del Ecuador, existe alrededor de 299.000 productores de leche, dentro del valor mencionado anteriormente, el 80% corresponden a granjas pequeñas o familiares, y el 20% pertenecen a granjas medianas y grandes, lo que significa que dentro de la zona industrial existen mayoritariamente empresas pequeñas, las cuales necesitan hacer inversiones económicas para mejorar la alimentación de las vacas, y, siendo fundamental, equipos y tecnologías dentro del mercado para la optimización del proceso de producción del producto final. [5]

Debido a las propiedades fisicoquímicas de la leche, es un medio en el cual fácilmente puede verse afectado la calidad final del producto terminado en la que incluya parámetros microbiológicos, como en la frescura y estado de conservación de la leche; sumando esto con las limitantes económicos mencionados en líneas anteriores con lo que respecta a las pequeñas industrias, asimismo, con alguna mala práctica de almacenamiento, procesamiento y/u otro problema en el desarrollo de fabricación de la leche, se realizan análisis finales a esta clase de productos lácteos, entre los cuales, la medición del pH y Acidez en leche, ayudan a estimar la acidez desarrollada, debido a la proliferación de bacterias, siendo que el producto es un medio sustancioso para el desarrollo de microorganismos, los cuales transforman la lactosa presente en la leche, en ácido láctico. [1]

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General.

- Validar un método para la determinación de acidez en muestras de leches, mediante técnica de titulación.

1.3.2. Objetivo Específicos.

- Diseñar el esquema de validación en función a los niveles de acidez que posee las matrices de leche.
- Estimar la precisión, repetibilidad, exactitud y reproducibilidad del método para la determinación de acidez en muestras de leche.
- Demostrar por medio de un análisis estadístico los resultados obtenidos durante el proceso de validación del método analítico.

1.4. Hipótesis

El ensayo propuesto para la determinación de acidez titulable en muestras de leche cumplirá con los parámetros de validación de las matrices propuestas establecidas por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE/INEN 13:1984, Leche, Determinación de la Acidez Titulable y Norma Técnica Ecuatoriana NTE/INEN 701:2009 Leche Larga Vida, Requisitos, Segunda Revisión, mediante procedimientos normalizados.

1.5. Alcance

El presente trabajo tiene como el alcance a las muestras o productos lácteos los cuales son expendidos y consumidos por la población en general, muestras que deben cumplir con las especificaciones y requisitos establecidos en las Normas de Ensayos aprobadas y vigentes por la autoridad sanitaria competente, suscrita en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 10:2012, donde se evidencia las tres muestras de leche dependiendo de su contenido de grasa (Entera, Semidescremada y Descremada), y la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13, la cual se complementa con la norma general, debido a que es el procedimiento a seguir para realizar el Análisis de Acidez Titulable en muestras lácteas.

CAPÍTULO 2.

MARCO TEÓRICO

2. Leche.

2.1. Definición.

La leche es un producto que se obtiene por la secreción normal de las glándulas mamarias de los animales de una hembra lechera bovino, los cuales se deben encontrar en un excelente estado de salud; la leche se obtiene dependiendo de cuantos ordeños se le realicen al espécimen los cuales deben de realizarse de forma higiénica, de manera completa y de forma continua. [6]

Según la Norma INEN 9:2012, la leche es un producto que se obtiene mediante la secreción mamaria de animales de origen bovino lecheros, los cuales se encuentran sanos, este producto se lo obtiene por uno o varios ordeños diarios, que se realiza de forma higiénica, completa y sin interrupciones, las cuales no se les ha añadido o extraído algún componente, la cual está destinada para un posterior tratamiento para el consumo humano. [7].

A su vez, el Codex Alimentario define a la leche como una secreción mamaria regular de animales lecheros obtenidos por medio de uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, dedicados al consumo a modo de leche líquida o a preparación ulterior. [8]

La leche de diferentes animales se compone de agua (85%), carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales.[9]

2.2. Tipos de leche

2.2.1. Larga Vida

La leche larga vida o leche UHT, es el tipo de leche procesada con la tecnología más actualizada existente para el procedimiento de la leche y para asegurar al consumidor una leche sana, segura y con una época más prolongado de almacenamiento. [10]

En el procesamiento, la leche pasa primeramente por la homogeneización – proceso físico que disminuye la magnitud de los glóbulos de grasa, incrementando el equilibrio de la leche y evitando la división de la grasa, mejor dicho, la formación de la nata. [11]

Posteriormente, la leche es sometida a ultra pasteurización – crecimiento de la temperatura entre 140°C y 150°C a lo largo de 2 a 4 segundos, en un flujo constante, e inmediato enfriamiento a una temperatura inferior a 32°C.[10]

2.2.2. Leche Cruda

Según el Codex Alimentarius define a la leche cruda como la muestra láctea que no ha sido sometida a procesos de calentamiento a más de 40°C, ni tampoco sometida a algún otro tratamiento similar, y que produzca un efecto equivalente.[12]

2.2.3. Leche Pasteurizada

Es la leche cruda homogenizada o no, que fue sometida a un proceso térmico que garantice la devastación total de los microorganismos patógenos y la casi integridad de los microorganismos saprofitos sin perturbar sensiblemente las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma. [13]

2.2.4. Leche Homogenizada

Muestra de leche la cual, previo al tratamiento térmico de pasteurización, fue sometido a homogeneización, con el fin de reducir el tamaño de los glóbulos de grasa, gracias al efecto de la presión y temperatura, para la estabilización de la materia grasa presente en la leche. [7]

2.2.5. Leche Termizada

Producto obtenido al someter muestras de leche cruda a procedimientos térmicos, con el fin de minimizar el número de microorganismos presentes y permitir un acopio más prolongado previo a someter a la elaboración ulterior. Las condiciones

del procedimiento térmico son mínimo aproximadamente de 62°C a lo largo de 15 a 20 segundos seguido de enfriamiento inmediato hasta temperatura de refrigeración. La leche termizada debería reaccionar de manera positiva a la prueba de fosfatasa alcalina, siendo prohibida su venta para su consumo humano en caso de ser positivo su resultado analítico. [14]

2.3. Clasificación de leche larga vida

2.3.1. Leche Entera

Se entiende con este nombre a la leche a granel higienizada, enfriada y mantenida a 5°C, sometida opcionalmente a terminación, pasteurización y/o estandarización de materia grasa, transportada en volúmenes de una industria láctea a otra para ser procesada y envasada bajo normas de higiene. [14]

La leche entera es el tipo de leche donde contiene la mayor concentración de grasa láctica, con un valor mínimo de 3 gramos por cada 100 gramos de leche. Por esta característica, su valor calórico como su porcentaje de colesterol es de mayor concentración comparados con la leche semidescremada y descremada.[9]

2.3.2. Leche Descremada

Esta clase de leche mantiene los nutrientes de la leche entera, exceptuando tres componentes: Grasa, vitaminas liposolubles y colesterol. Por ello, los fabricantes de esta clase de productos se ven en la necesidad de añadir las vitaminas que se pierden, por el tratamiento que se realiza a las muestras. [15]

2.3.3. Leche Semidescremada

La leche semidescremada es el tipo de leche la cual se ha sustraído parcialmente el contenido graso, la concentración del contenido graso se encuentra dentro de 1,5 y 1,8 gramos por 100 gramos de leche. Las características organolépticas varían, en la que su sabor es menos intenso, y su valor nutritivo baja por la pérdida de vitaminas liposolubles, sin embargo, en esta clase de leches que se

realizan tratamientos, se las enriquecen para equiparar la cantidad de vitaminas que han perdido en el proceso del desnatado.

[15]

2.3.4. Leche Deslactosada

La leche deslactosada, es aquella que pueden consumir las personas que tienen intolerancia a la lactosa (el azúcar de la leche). Esto ocurre cuando el cuerpo es incapaz de producir suficiente lactasa, que es la enzima encargada de procesar la lactosa. Este componente condesciende la división de la glucosa y la galactosa, azúcares que forman la lactosa en la leche, si esta reacción no ocurre, no pueden ser absorbidas, es decir, a esta clase de leche se le adiciona lactasa para que hidrolice la lactosa.[16]

2.4. Composición de la leche

Dependiendo del origen animal de la leche, comúnmente se encuentra compuesta en su mayoría por agua (85% aproximadamente), grasa, proteína, hidratos de carbono, minerales y vitaminas. [17]

En la Tabla 2-1 se puede evidenciar las diferencias en la composición de leches provenientes de diversos animales:

Tabla 2-1 Composición de la leche (x 100g de leche).

ESPECIE	MATERIA GRASA (g)	LACTOSA (g)	MINERALES (g)	CENIZAS (g)	CALCIO (mg)	PROTEÍNAS (g)
Mujer	3.5	6.5	0.25	0.2	32.2	1.4
Vaca	3.5	4.7	0.8	0.7	119	3.5
Oveja	7.5	4.5	0.95	1	193	6.0
Cabra	4.3	4.7	0.8	0.8	133	4.0

Autor: [6]

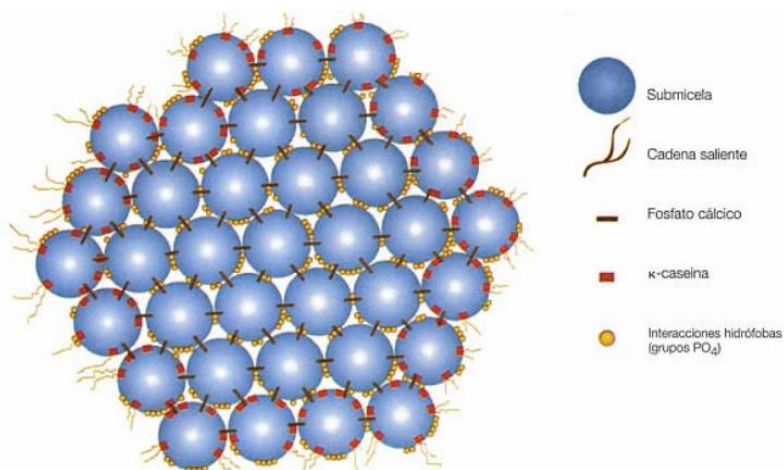
2.4.1. Proteínas

La proteína más exuberante en la leche es la caseína, seguida de las proteínas del lactosuero (lactoalbúminas y lactoglobulinas). En porciones tienen la

posibilidad de descubrir otras como las que conforman la pared de los glóbulos grasos, las fosfolipoproteínas. [18]

La caseína en su más grande proporción está constituyendo las llamadas submicelas, que tienen la posibilidad de llegar a medir hasta 0.4 micras de diámetro y que tienen la posibilidad de unirse, paralelamente, por medio de fosfato cálcico (el conjunto hidroxilo del aminoácido se esterifica con ácido fosfórico que se une al calcio) conformando micelas, que se hallan en suspensión coloidal. [19]

Figura 2-1 Miscela de la Caseína de la Leche



Autor: [6]

2.4.2. Materia grasa

La materia grasa de la leche está en emulsión en la disolución acuosa que constituye la leche. Se encuentra compuesta prácticamente, por triglicéridos y tiene otras sustancias en porciones menores en medio de las que se hallan las vitaminas liposolubles (Vitamina A, Vitamina D, Vitamina E y Vitamina K). [20]

2.4.3. Hidratos de Carbono

La lactosa es básicamente el característico carbohidrato presente en la leche, además es el típico producto donde se puede hallar esta clase de azúcar. Hablamos de un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. La lactosa es soluble en agua y, en ese sentido se muestra en la leche. Para su digestión es

elemental la existencia de una enzima que catalice el proceso de hidrólisis, llamada lactasa. [20]

Cierto porcentaje poblacional muestran inconvenientes de digestibilidad de la lactosa. Se ha comprobado que, si bien el cuerpo humano de los bebés genera lactasa, enzima que posibilita la digestión de la lactosa de la leche de vaca, no es de esta forma en los adultos, y pueden darse en una proporción alta poblacional adulta situaciones de intolerancia a la lactosa. La incidencia de esta intolerancia se ve mayormente reflejada entre los pueblos asiáticos o africanos, menos recurrentes en los centroeuropeos y aún menor en las naciones del norte del continente Europeo. [21]

La lactosa es el elemento que limita la producción de leche; o sea, que la proporción de leche producida es dependiente de las maneras de síntesis de la lactosa en la mama (es el componente soluble más exuberante y su actividad osmótica es muchísimo más alta que la de los demás componentes).

La lactosa es el elemento de la leche más lábil ante la acción microbiana; en impacto la leche es de forma sencilla presa de bacterias de diferentes tipos, que convierten la lactosa en ácido láctico u en otros ácidos alifáticos. [22]

2.4.4. Sales minerales

Los minerales que se encuentran presentes en la leche y sus valores en porcentaje son el calcio (1.3), sodio (0.5), potasio (1.8), magnesio (0.14), fósforo (1.0), Cloruro de Sodio (1.1), Azufre (0.3), CO₂ (0.2) y Ácido cítrico (1.8). [22]

El calcio es uno de los minerales que se encuentra en mayor proporción en las leches de las diferentes matrices de su proveniencia; esta sal, en su mayoría, se encuentra formando micelas de caseína; existen pequeñas cantidades de hierro, cobre, yodo y otras sales en las muestras, pero se encuentran en forma de trazas. [23]

2.4.5. Enzimas.

Las lipasas, peroxidasas y lipasas, son algunas de las enzimas más importantes presentes en la leche. Asimismo, la fosfata alcalina se encuentra disuelta en el medio, sirviendo como indicador para el tratamiento térmico (pasteurización), ya que esta se desactiva a temperaturas elevadas, y su medicación es relativamente factible, en la que ocurre la hidrólisis con el fenilfosfato sódico, en la cual se calcula la presencia del fenol liberado).

Por lo anteriormente descrito, la muestra de leche que no se encuentre activada la fosfatasa alcalina, es una muestra que ha sido sometida a tratamiento térmico que permita su venta. [23]

2.4.6. Vitaminas Hidrosolubles

Las vitaminas hidrosolubles, se las encuentran presentes en la fase acuosa, el cual está en la leche desnatada y suero lácteo, dentro de estas, las principales y que se encuentran en mayor proporción son las Vitaminas C, B₂ y B₁₂.

Varias vitaminas se inactivan por el calor, la oxidación o la fotólisis (efecto de la luz solar y las radiaciones). La actividad vitamínica de la leche puede por ella reducirse en el curso de los tratamientos industriales. [22]

2.5. Características organolépticas de la leche

2.5.1. Textura

La textura de la leche oscila dentro de 1,5 a 2,0 Centipoise a 20°C, ligeramente superior a los 1,0 Cp que posee el agua.

Esta viscosidad podría ser alterada por el desarrollo de ciertos microorganismos capaces de crear polisacáridos que por la acción de aumentar agua se incrementa la viscosidad de la leche.[24]

2.5.2. Color

Líquido de color blanco opalescente característico gracias a la refracción de la luz una vez que los rayos de luz inciden sobre las partículas coloidales de la leche en

suspensión. Una vez que es bastante rica en grasa, muestra una coloración cremosa, debido al caroteno que tiene la grasa, la leche baja en grasa toma un color sutilmente azulado. [25]

2.5.3. Sabor

La leche posee un sabor característico, comúnmente no posee un sabor ácido ni amargo, más bien, posee un sabor ligeramente dulce, conllevado por el contenido de lactosa en su composición. [26]

2.5.4. Olor

Por el contenido de ácidos, aldehídos, cetonas y sulfatos que se encuentran en trazas, el olor de la leche es característico, la mezcla de los componentes químicos orgánicos volátiles de peso molecular bajo. [26]

2.6. Ordeño

El ordeño retira la leche que se acumula en el reservorio de la glándula y sistema de conductos, un estímulo neuroendócrino genera la bajada de la leche, en el cual la contracción de las células mioepiteliales en torno al alvéolo provoca que la leche sea comprimida hacia fuera del mismo, adentro del sistema de conductos. [27]

La leche es un producto enormemente perecedero y puede servir como un sorprendente medio de cultivo para bacterias. Por consiguiente, el funcionamiento higiénico y a tiempo de la leche a partir del instante que deja la vaca es fundamental para eludir la pérdida del costo nutritivo de la misma.

2.6.1. Ordeño Manual

El ordeño manual es el procedimiento de elección en hatos que son pequeños. La complejidad de conservar las máquinas, de obtener repuestos, o el abasto interrumpido de electricidad son causas para realizar el ordeño manual. La salud

de la ubre de la vaca va a ser mejor con un óptimo ordeño manual que con una máquina de ordeñar mal mantenida.

Los pezones tienen que ser lavadas y secadas correctamente, y las manos del ordeñador tienen que hallarse limpias y secas. Cada mano debería de tomar todo el extenso del pezón. [28]

Los dedos pulgares y el índice tienen que ser usados para comprimir la parte preeminente del pezón en lo que la mano lo aprieta plenamente. Por consiguiente, la presión dentro del pezón aumenta y la leche es forzada fuera del canal. Los cuartos posteriores tienen que ordeñarse primero debido a que ellos tienen dentro la mayoría de la leche. Se debería de tener cuidado para prevenir que pelos y polvo caigan dentro del balde. Cada una de las ocupaciones sobre la rutina de ordeño, preparación de la ubre y limpieza, se utilizan igualmente al ordeño manual como al mecánico. [22]

2.6.2. Ordeño Mecánico

Pese a que hay varios diseños diferentes de sistemas de aparatos de ordeñar, todos comparten varias de las propiedades primordiales enfocadas a utilizar una idónea forma de succión en los pezones removiendo la leche hacia un punto de recolección. En todos los sistemas, una bomba de vacío aplica succión para remover viento a un ritmo constante. Una trampa sanitaria está presente para conservar separadas la línea de leche y la línea de vacío, y eludir el desplazamiento de líquidos en medio de las piezas "sanitarias" y "no sanitarias" del sistema. [22]

2.7. Transporte de leche

La leche debe ser almacenada en refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ rápidamente a partir del ordeño o entregarse a la planta de enfriamiento o procesamiento en el período de tiempo más corto que se pueda, garantizando la conservación e inocuidad, debido a que la calidad de la leche es muy sensible. [20]

La leche debe ser transportada en tanques diseñados para este fin o tanques isotérmicos de aceros inoxidable. No se posibilita el uso de recipientes plásticos. [26]

2.8. Acidez titulable

Los ácidos orgánicos presentes en los alimentos influyen en el sabor, color y el equilibrio de estos, los cuales los son las propiedades organolépticas visibles al detectar en cualquier alimento.

La determinación se fundamenta en una interacción ácido-base, donde la muestra se sitúa en una solución acuosa y se titula con una solución de NaOH con una normalidad conocida, frente a la presencia de un indicador (fenolftaleína). Una vez que la muestra se colorea se titula potenciométricamente hasta pH 8.4. [29]

Químicamente, la reacción de la acidez titulable se determina por medio de la reacción estequiométrica entre una solución titulante alcalino, y la concentración total de ácidos presentes en la muestra hasta que se establezca la neutralización de las soluciones. [17]

Lo que se denomina acidez presente en la leche involucran dos clases de acidez, la acidez actual y la potencial. La acidez actual se ve reflejado en los grupos H^+ en estado libre, con lo que respecta a la acidez potencial, esta incluye los componentes de los productos lácteos, en los que, por medio de la titulación, se logra liberar grupos H^+ en la solución, en a que se adiciona a la leche un volumen necesario de una solución salina alcalina valorada o estandarizada, hasta llegar al pH donde cambia el color del indicador colocado dentro de la solución problema, en el que, varia su coloración de incolora (en muchos casos blanquinosa por el color propio de la leche) a rosado, alcanzando un pH de 8,3. [30]

De este modo, la acidez titulable incluye la acidez natural y desarrollada de la leche, de hecho, es la suma de cuatro reacciones demostradas en la Figura 2-2.

Las primeras reacciones pertenecen a la acidez natural de la leche:

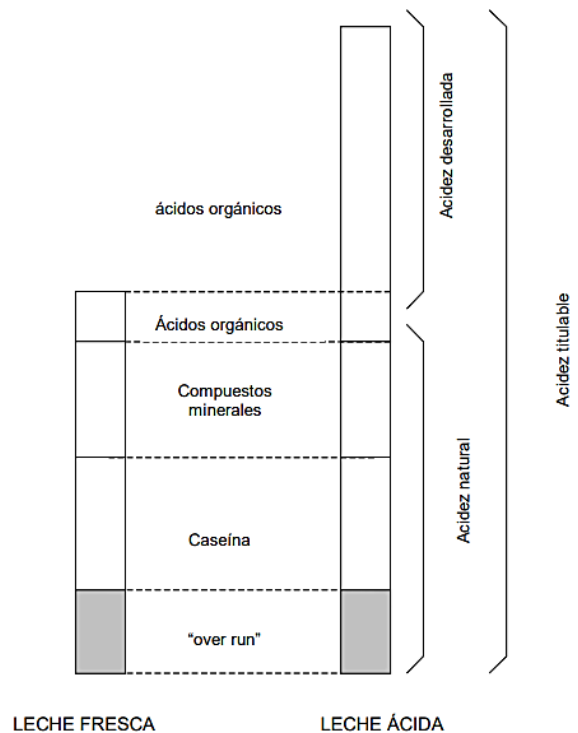
Acidez correspondiente a la Caseína, la cual representan $\frac{2}{5}$ de la acidez propia de la leche.

Acidez correspondiente a minerales y ácidos orgánicos, los cuales representan $\frac{2}{5}$ de la acidez propia de la leche.

Reacciones secundarias correspondiente a los fosfatos, los cuales representan $\frac{1}{5}$ de la acidez propia de la leche.

La acidez desarrollada retribuye al ácido láctico y a otros ácidos provenientes de la degradación de microorganismos de la lactosa, y de los lípidos.

Figura 2-2 Reacciones de la Acidez en Leche



Autor: [31]

En consecuencia, la acidez titulable constituye una medida de la concentración de proteínas y fosfatos en leche, los cuales contienen una excelente calidad higiénica-sanitaria. [32]

2.9. Ácido láctico

El ácido láctico fue descubierto por el Químico Scheele Swedish en el año 1780, el cual lo considero al comienzo como un componente que se hallaba en la leche agria.

Sin embargo, Louis Pasteur descubrió que no era un componente de la leche, determinando que la fermentación láctica se debe a la presencia de microorganismos (*Lactobacillus*), el cual era generado por la reacción de fermentación provocada por algunos microorganismos.[33]

Desde el punto de vista químico, es un ácido hidroxicarboxilios más frecuentes, el cual es producido por animales, plantas y microorganismos. Su estructura química consta de dos átomos de carbono terminales, uno de ellos formando el grupo carboxilo y un átomo de carbono central, el cual está ligado el grupo funcional hidroxilo.

En la Tabla 2-2 se puede apreciar algunas propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.

Tabla 2-2 Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.

Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃
Peso Molecular	90.08
Índice de refracción	1.44
Punto de fusión	L (+) y D (-): 52.8 A 54°C
	DL:16.8 a 33°C
Punto de ebullición	125-144°C
Gravedad especifica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40.33 mNsm ⁻²
Densidad	1.249
Constante dieléctrica	22 e

Autor: [34]

2.10. Validación

La validación es definida como la capacidad de demostrar documentos objetivos, que proporcionan un proceso implícito, con un gran porcentaje de veracidad de alguna metodología. [35]

Los causantes de garantizar que los procedimientos se encuentren correctamente validados son los laboratorios, que dan trabajos extras para equiparar sus datos logrados con los datos ya establecidos.[36]

La validación da documentos y procesos estables, en que los laboratorios tienen la posibilidad de medir, los límites de rendimiento aceptables como, por ejemplo: linealidad, especificidad, exactitud, precisión. [37]

Se valida un procedimiento, para la verificación de los parámetros a realizar, los cuales deben ser adecuados para el problema analítico específico, entre ellos:

- El desarrollo de un nuevo método a realizar.
- Para la mejora de un método ya establecido.
- Para indicar diferencia de un método nuevo y un método ya establecido.
- Para implementar un método ya establecido, en un laboratorio diferente, o en diferentes equipos [36]

2.11. Precisión

Es una medida en la cual muestra la concordancia de los resultados analíticos alcanzados, una vez que se hace algunas veces el mismo procedimiento.

La precisión nos sugiere los errores aleatorios que pasa en el procedimiento, una vez que se hace las repeticiones de la muestra. [38]

La expresión del grado de precisión, normalmente se la utiliza para obtener la imprecisión del método, que se la mide calculando la desviación estándar a los resultados analizados durante la experimentación. [39]

En la medida de precisión, las más comunes utilizadas son:

2.11.1. Repetibilidad

Representa la precisión, en un grupo de datos logrados en la repetición de una muestra, con un solo analista, con un mismo equipo y laboratorio en un corto tiempo, lo que es eficaz para evaluar las variaciones que se muestran en el

procedimiento llevadas a cabo, en la que se establece la desviación estándar, del coeficiente de alteración y el porcentaje. [39]

2.11.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se hace, una vez que se usa los resultados de los estudios conseguidos en un mismo procedimiento, empero en diferentes laboratorios, diferentes analistas, y diferentes grupos, a lo largo de una época prolongado. [39]

2.11.3. Robustez

La robustez tiene la función de no verse perjudicado por pequeños cambios analíticos tales como: la temperatura del ensayo, diferentes laboratorio, reactivos y analistas [40]

La robustez de un procedimiento analítico es el nivel de reproducibilidad de los resultados conseguidos del estudio de las mismas muestras bajo distintas condiciones como por ejemplo diferentes laboratorios, analistas, artefactos, lotes de reactivos, temperaturas, días, etcétera. Un procedimiento analítico es robusto una vez que otorga resultados con presión y precisión aceptables en condiciones de trabajo del medio ambiente y/o analíticas diferentes. [41]

La robustez es un parámetro, empleado en el laboratorio para mejora y proporcional fiabilidad del método, este parámetro se lo usa para averiguar el efecto de la precisión y la exactitud del método [36]

2.11.4. Exactitud

La exactitud es un parámetro que demuestra, la proximidad entre los resultados obtenidos en las pruebas y el valor verdadero, la exactitud se estudia como: la veracidad y precisión. [39]

La exactitud de un procedimiento analítico; es la cercanía de los resultados de la prueba conseguidos por dicho procedimiento al costo aceptado como verdadero. La precisión debería establecerse en todo el intervalo detallado del método analítico Se evalúa usando un mínimo de 9 determinaciones en un mínimo de 3

niveles de concentración que cubran el intervalo detallado (por ejemplo, 3 replicados en todas 3 concentraciones del método analítico total). [42]

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño de la Investigación

El presente estudio de investigación tiene un enfoque cuantitativo, debido que el objetivo es adquirir datos a través de la medición numérica y el análisis estadístico para probar una hipótesis descrita en párrafos preliminares.

Durante el trabajo investigativo se utilizó un nivel explicativo, ya que se desea conocer la variabilidad de la acidez titulable presente en las 3 matrices principales que se realizan los muestreos para el nivel II para los análisis comparados con el Certificado de Análisis del Producto Final y determinar la calidad de los productos lácteos que se comercializan en el territorio ecuatoriano.

Asimismo, se utilizó la investigación por fuentes de datos, esto comprende en revisión bibliográfica de las metodologías que se usan para la determinación de acidez titulables en muestras provenientes de la leche vacuna, comparadas con las Normas Nacionales que rigen dentro del grupo de los productos lácteos.

Por último, se utilizó una investigación experimental, con el fin de validar la metodología de acidez titulable con la finalidad de verificar la calidad de los resultados emitidos durante los análisis, por lo que se procedió a realizar ensayos dentro del Laboratorio de Referencia de la ARCSA en el área de Bromatología de Alimentos.

3.2. Población.

Productos lácteos larga vida de origen vacuno comercializados dentro del Ecuador, divididos en matrices de acuerdo con la clasificación según la cantidad de grasa.

3.3. Muestra

Muestras de leches larga vida, dentro de esta clasificación se encuentra las matrices:

- Leche entera,
- Leche descremada,
- Leche Semidescremada.

3.4. Métodos y Materiales

Tabla 3-1 Materiales a Utilizar para la Acidez Titulable

Equipos	Reactivos
Balanza Analítica	Solución 0,1N de Hidróxido de Sodio Estandarizada
Matraz Erlenmeyer 125 cm ³	Solución Indicadora de Fenolftaleína al 1%
Matraz Aforado de 500 cm ³	Agua destilada Libre de Co ₂
Bureta de 25 cm ³	Material de Referencia de Leche para control de calidad.
Estufa con ajustador de temperatura a 103°C ± 2°C.	Ftalato Ácido de potasio
Desecador	
Termómetro	
Agitador de Vidrio	
Equipo de Baño María (De ser necesario)	

Autor: *Propio.*

3.4.1. Metodología

El presente trabajo investigativo se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Referencia ubicado en Julián Coronel y Esmeraldas, en la ciudad de Guayaquil.

La primera etapa del presente trabajo fue la revisión bibliográfica acerca de las normativas que rigen en los productos lácteos pasteurizados para su comercialización y distribución. De igual modo, se revisó información documental de trabajos científicos e investigativos sobre los análisis de calidad de leche vacuna.

La metodología de referencia utilizada es tomada de la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13:1984, también se revisó la metodología de la AOAC 16.023, que es una metodología en la que se fundamenta la Normativa Ecuatoriana para las Leches Pasteurizadas.

Se tendrán 3 matrices de muestras de leches, dentro de las cuales son de Leche Entera, Leche Descremada, Leche semidescremada; en cada una de estas, se obtendrán 3 muestras de industrias diferentes, en la cual se tomarán muestras que sean del mismo lote de fabricación y durante el análisis, se hará por duplicado los análisis según el procedimiento de la Norma INEN.

Por otro lado, se tendrá que lavar correctamente los matraces, luego llevar a secar en estufa a 100°C aproximadamente por 2 horas, y llevarlos al desecador para su atemperación, inmediatamente se pesa cada peso de matraz en balanza, se anota los gramos del matraz para dar inicio al análisis correspondiente.

Se debe estandarizar la solución de Hidróxido de sodio para determinar la cantidad requerida de la base para que ocurra la reacción química del viraje del color de la muestra hasta su neutralización.

La muestra se debe llevar a 20°C hasta homogenización, enseguida dentro del matraz pesar 20g de muestra, y diluir la muestra con un volumen dos veces mayor al pesado de la muestra con agua destilada, y se agrega 5 gotas de la solución alcohólica de fenolftaleína.

Se llena la bureta con la solución de 0.1N de Hidróxido de Sodio, previamente estandarizada, y se comienza a titular la muestra hasta llegar al viraje de color rosado pálido, el cual debe persistir por 30 segundos, se lee el consumo de la bureta de la solución de Hidróxido de Sodio empleada para la reacción química.

Después se realizan cálculos con la fórmula establecida para determinar la concentración en porcentaje de ácido láctico presente en la muestra, empleando la ecuación para determinar la acidez titulable.

3.5. Validación de Método

La validación del método se realizó en Leche UHT en 3 puntos (leche entera, leche semidescremada, leche descremada), con 20 repeticiones promediadas con su duplicado, cada analista realizó 10 repeticiones cada uno.

Tabla 3-2 Matriz y Puntos Utilizados

MATRIZ	PUNTOS
LECHE UHT	LECHE ENTERA
	LECHE SEMIDESCREMADA
	LECHE DESCREMADA

Autor: Propio

Los puntos propuestos han sido tomados de la data de ingresos al área de bromatología de alimentos para el análisis de control nivel II para la evaluación analítica de los componentes de las muestras de leche, en la cual se encontró que el tipo de leche que se ingresó es la de Leche UHT, dentro de las cuales han ingresado Leche Entera, Leche semidescremada y leche descremada.

Durante el desarrollo del trabajo investigativo, la validación del método de Acidez titulable se basó en la obtención de exactitud, precisión e incertidumbre.

Para determinar el valor de incertidumbre de las medidas implícitas en los análisis y metodología, se empleó Tablas de Análisis de Varianza (ANOVA).

En caso de los cálculos de la estimación de la incertidumbre, se subclasifican en:
TIPO A: Se realiza mediante el estudio estadístico de la desviación estándar máxima de repetibilidad y reproducibilidad.

TIPO B: Es la contribución de la incertidumbre y resolución de equipos calibrados (Certificado de calibración de la balanza analítica y Buretas)

3.5.1. Incertidumbre Combinada.

La incertidumbre de una medición cuando el resultado se obtiene a partir de la raíz cuadrada positiva de las contribuciones de tipo A y de tipo B.

$$\mu_{\text{combinada}} = \sqrt{\mu_R^2 + \mu_{\text{Balanza}}^2 + \mu_{\text{Bureta}}^2 + \mu_{\text{Exactitud}}^2}$$

3.5.2. Incertidumbre Expandida

La incertidumbre expandida es una magnitud que define un intervalo alrededor del resultado de una medición el que se espera cubra una fracción grande de la distribución de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mesurando.

$$\mu_{\text{expandida}} = \mu_{\text{combinada}} \times k$$

k= factor de cobertura= 2 (95%).

3.5.3. Factor de Cobertura (k)

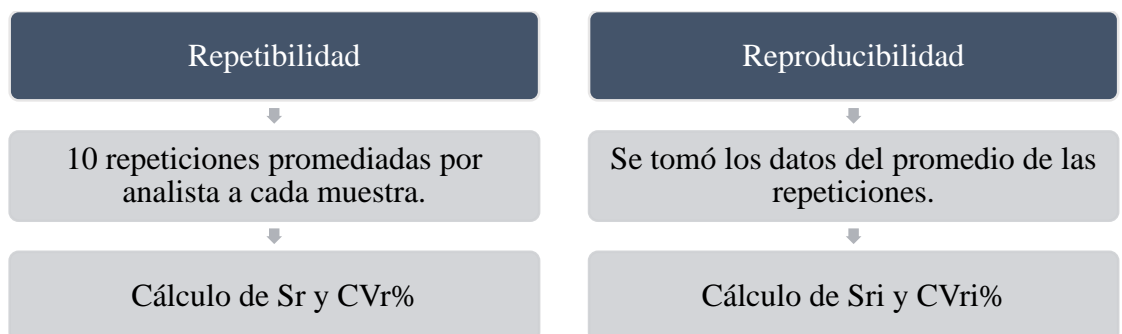
Factor que puede considerarse como la probabilidad de cobertura o nivel de confianza del intervalo, factor numérico usado como multiplicador de la incertidumbre combinada para obtener una incertidumbre expandida. El factor de cobertura se encuentra típicamente en el intervalo de 2 a 3.

De acuerdo con el tipo de método de validación se evaluó precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y Exactitud.

Se determinó la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

3.5.4. Repetibilidad y Reproducibilidad

Tabla 3-3 Repetibilidad y Reproducibilidad



Autor: Propio

3.5.5. Exactitud:

Se evidenció la capacidad del método para dar resultados lo más cercano posible a un valor verdadero, en donde se participó Pruebas de Interlaboratorio, en la cual participó el Área de Bromatología de Alimentos del Laboratorio de Referencia.

Para este tipo de análisis no se necesita obtener una curva de calibración, pero es necesario realizar el análisis respectivo con un material de referencia de leche, para el correcto desarrollo del método el cual se está validando.

CAPÍTULO 4

4. Resultados

El análisis de la data obtenida se basó en el estudio, interpretación y tabulación de los resultados obtenidos mediante la ejecución de análisis de laboratorio, en conjunto con métodos estadísticos, los cuales proporcionaron datos exactos y reales, los cuales fueron sustentados con una extensa revisión bibliográfica.

4.1. Reporte de resultados

En el presente trabajo experimental para la validación de la metodología, los resultados fueron obtenidos por 2 analistas, debido a los parámetros de validación necesarios, como precisión (reproducibilidad y repetibilidad).

Asimismo, los dos analistas responsables de la ejecución de los análisis tuvieron las mismas muestras de matrices y puntos, los cuales fueron identificados con los mismos números de lote, fecha de fabricación, fecha de expiración y del mismo fabricante.

Para la determinación de la Acidez titulable en las muestras a determinar el ácido láctico presente, se debe ejecutar la siguiente ecuación para la determinación del porcentaje del factor problema:

$$A= 0,090 \frac{VxN}{m_1-m} x100$$

En donde:

A = acidez titulable de la leche, en porcentaje en masa de ácido láctico.

V = volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, en cm³.

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

m = masa del matraz Erlenmeyer vacío, en g.

m₁ = masa del matraz Erlenmeyer con la leche, en g.

4.1.1. Estandarización de la Hidróxido de Sodio 0.1N.

Para la obtención del porcentaje de ácido láctico en las muestras a analizar, se requiere titular frente a una base estandarizada, por lo cual, se tuvo que preparar

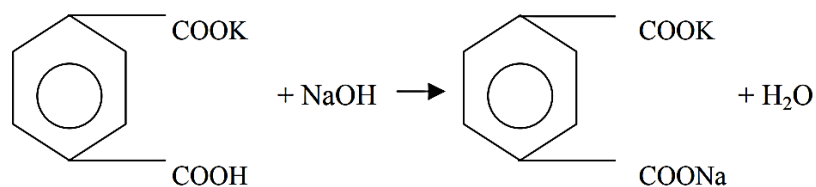
3 litros de Hidróxido de Sodio para la totalidad de análisis que se efectuaran en todas las muestras.

Para realizar el reactivo de Hidróxido de Sodio 0.1N aproximadamente se debe tener en cuenta que el peso molecular del Hidróxido de sodio es de 39.997 g/mol, por lo cual se aplica la siguiente ecuación:

$$x = \frac{40\text{g NaOH}}{x} \times \frac{1000\text{ mL}}{3000\text{ mL}} \times \frac{1\text{ N}}{0.1\text{ N}} = 12\text{ g NaOH para } 3000\text{ mL de H}_2\text{O Tipo 1.}$$

Por lo descrito anteriormente, se debe pesar 12 g de Hidróxido de Sodio en balanza analítica para los 3 L que se requiere para los análisis respectivos, al no ser el hidróxido sódico un patrón primario, esta disolución solo será aproximadamente 0.1 N, por lo que es necesario estandarizarla para conocer exactamente su concentración. La estandarización se debe realizar con el patrón primario de ftalato ácido de potasio, en la cual se emplea la fenolftaleína para la titulación; el viraje de color ocurre cuando el NaOH en su totalidad ha reaccionado, formado el ftalato de sodio y potasio.

Figura 4-1 Reacción Química del Ácido Láctico frente al Hidróxido de Sodio.



Autor: [34]

Lo siguiente es pesar 0,25 g de Ftalato ácido de Potasio, previamente secado por 2 horas a 110°C, y enfriado en desecador. Una vez pesado y anotado el peso del patrón primario se emplea la siguiente fórmula para determinar la normalidad exacta de la solución de NaOH.

$$\frac{\text{peso ftalato de } k}{\text{Consumo } \times 0,20242 \text{ (Constante de Estandarización)}}$$

Se realiza por triplicado la titulación y se realiza un promedio de los tres resultados para obtener la normalidad requerida. En la tabla 4-1, se evidencia los resultados de la normalidad realizada por triplicado.

Tabla 4-1 Normalidad del Hidróxido de Sodio Estandarizado

PESO FTALATO ÁCIDO DE K (0,2553g)			
PESO	PESO	CONSUMO	NORMALIDAD
PESO 1	0,2551	12,7	0,099232359318
PESO 2	0,2552	12,8	0,098495702006
PESO 3	0,2551	12,9	0,097693873127
PROMEDIO DE NaOH ESTANDARIZADO			0,098 N

Autor: Propio

4.1.2. Data primaria de acidez en leche entera.

En las Tablas 4-2 y 4-3, reflejan los valores de los promedios de la acidez titulable presente en la muestra de leche entera, obtenidos de los analistas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 4-2 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Entera ANL 1

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA (g)	MASA DE MATRAZ (g)	PESO MUESTRA (g)	FORMULA
MUESTRA 1	3,2	93,6424	73,6125	20,0299	0,141
MUESTRA 2	3,2	112,1392	92,1385	20,0007	0,141
MUESTRA 3	3,1	96,3944	76,3634	20,031	0,137
MUESTRA 4	3,2	117,1944	97,1849	20,0095	0,141
MUESTRA 5	3,2	116,0609	96,0078	20,0531	0,141
MUESTRA 6	3	118,7865	98,7659	20,0206	0,132
MUESTRA 7	3,2	97,0941	77,05	20,0441	0,141
MUESTRA 8	3,1	96,6555	76,6347	20,0208	0,137
MUESTRA 9	3	96,2633	76,2511	20,0122	0,132
MUESTRA 10	3	112,5524	92,5261	20,0263	0,132

Autor: Propio

Tabla 4-3 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Entera ANL 2.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA (g)	MASA DE MATRAZ (g)	PESO MUESTRA (g)	FORMULA
----------------	---------------------	--	---------------------------	-------------------------	----------------

MUESTRA 1	3,3	97,7643	77,7577	20,0066	0,145
MUESTRA 2	3,2	111,8466	91,8357	20,0109	0,141
MUESTRA 3	3,15	107,273	87,2718	20,0012	0,139
MUESTRA 4	3,2	108,6306	88,6051	20,0255	0,141
MUESTRA 5	3,1	112,6504	92,5776	20,0728	0,136
MUESTRA 6	3,25	95,7888	75,7661	20,0227	0,143
MUESTRA 7	3,1	118,5055	98,4105	20,095	0,136
MUESTRA 8	3,2	100,4356	80,4208	20,0148	0,141
MUESTRA 9	3,335	114,1198	94,0153	20,1045	0,146
MUESTRA 10	3,2	103,0241	83,021	20,0031	0,141

Autor: Propio

4.1.3. Data primaria de acidez en leche semidescremada.

En las Tablas 4-4 y 4-5, reflejan los valores de los promedios de la acidez titulable presente en la muestra de leche entera, obtenidos de los analistas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 4-4 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Semidescremada ANL 1.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA (g)	MASA DE MATRAZ (g)	PESO MUESTRA (g)	FORMULA
MUESTRA 1	3,2	107,9676	87,9649	20,0027	0,141
MUESTRA 2	3,25	97,139	77,1097	20,0293	0,143
MUESTRA 3	3,17	114,8073	94,781	20,0263	0,14
MUESTRA 4	3,2	120,7094	100,6838	20,0256	0,141
MUESTRA 5	3,22	112,5769	92,5455	20,0314	0,142
MUESTRA 6	3,2	105,6305	85,6181	20,0124	0,141
MUESTRA 7	3,18	118,8269	98,8225	20,0044	0,14
MUESTRA 8	3,15	109,7028	89,666	20,0368	0,139
MUESTRA 9	3,16	103,4522	83,3888	20,0634	0,139
MUESTRA 10	3,2	110,951	90,9409	20,0101	0,141

Autor: Propio

Tabla 4-5 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Semidescremada ANL 2.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA (g)	MASA DE MATRAZ (g)	PESO MUESTRA (g)	FORMULA
MUESTRA 1	3,2	112,6722	92,6458	20,0264	0,141
MUESTRA 2	3,15	96,7372	76,7276	20,0096	0,139
MUESTRA 3	3,2	107,2716	87,2491	20,0225	0,141
MUESTRA 4	3,25	102,9896	82,9836	20,006	0,143

MUESTRA 5	3,2	95,7438	75,7022	20,0416	0,141
MUESTRA 6	3,25	105,6141	85,5835	20,0306	0,143
MUESTRA 7	3,25	117,1938	97,1655	20,0283	0,143
MUESTRA 8	3,25	118,3751	98,3697	20,0054	0,143
MUESTRA 9	3,15	100,4035	80,379	20,0245	0,139
MUESTRA 10	3,2	96,3541	76,3405	20,0136	0,141

Autor: Propio

4.1.4. Data primaria de acidez en leche descremada.

En las Tablas 4-6 y 4-7, reflejan los valores de los promedios de la acidez titulable presente en la muestra de leche entera, obtenidos de los analistas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 4-6 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Descremada ANL 1.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA (g)	MASA DE MATRAZ (g)	PESO MUESTRA (g)	FORMULA
MUESTRA 1	3,2	95,7599	75,7316	20,0283	0,141
MUESTRA 2	3,18	108,6163	88,6069	20,0094	0,14
MUESTRA 3	3,15	111,8287	91,8177	20,011	0,139
MUESTRA 4	3,22	117,3489	97,3214	20,0275	0,142
MUESTRA 5	3,2	107,2883	87,2688	20,0195	0,141
MUESTRA 6	3,22	96,6331	76,611	20,0221	0,142
MUESTRA 7	3,22	89,7547	69,7239	20,0308	0,142
MUESTRA 8	3,15	105,6351	85,5982	20,0369	0,139
MUESTRA 9	3,24	111,593	91,5821	20,0109	0,143
MUESTRA 10	3,2	110,873	90,8617	20,0113	0,141

Autor: Propio

Tabla 4-7 Data Porcentaje de Acidez Titulable en Leche Descremada ANL 2.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA (g)	MASA DE MATRAZ (g)	PESO MUESTRA (g)	FORMULA
MUESTRA 1	3,3	141,053	120,9693	20,0837	0,145
MUESTRA 2	3,25	145,0926	125,0353	20,0573	0,143
MUESTRA 3	3,2	136,5766	116,5752	20,0014	0,141
MUESTRA 4	3,2	118,3241	98,3198	20,0043	0,141
MUESTRA 5	3,2	149,7691	129,7561	20,013	0,141
MUESTRA 6	3,25	152,0338	131,9743	20,0595	0,143
MUESTRA 7	3,2	113,1727	93,1339	20,0388	0,141

MUESTRA 8	3,2	110,706	90,6654	20,0406	0,141
MUESTRA 9	3,25	145,0845	125,0491	20,0354	0,143
MUESTRA 10	3,2	111,1579	91,1261	20,0318	0,141

Autor: Propio

4.1.5. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad en leche entera.

La razón por la cual se realiza el análisis de repetibilidad es para determinar si los analistas involucrados en un proceso experimental en laboratorio pueden obtener resultados semejantes estadísticamente en una misma muestra en diferentes réplicas.

El motivo por el cual se realiza el análisis de reproducibilidad es con el fin de determinar si los 2 analistas pueden obtener resultados similares estadísticamente al momento de realizar los análisis en una misma muestra, pero en diferentes replicas.

La data de Límite de Reproducibilidad (LR) se comprueba si el valor es menor o igual a aquel de la diferencia absoluta entre resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad, el cual se espera una probabilidad de 95%.

Los valores de Límite de Repetibilidad (Lr) comprueban si el valor es similar o inferior a la diferencia absoluta entre dos resultados en pruebas individuales, obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, se espera que cumpla una probabilidad de 95%. [36]

Para determinar el valor de la repetibilidad y reproducibilidad en un número grande de grados de libertad $k=2$ a un nivel de confianza del 95% se suele aproximar como:

$$r = 2.8 \times S_r \text{ en caso de Limite de Repetibilidad, y;}$$

$$r = 2.8 \times S_R \text{ en caso de Limite de Reproducibilidad.}$$

En la Tabla 4-8, manifiesta los valores promediados de la acidez titulable en muestras de leche entera y en la Tabla 4-9 se reporta el análisis de varianza con un valor F de 4,1384248 siendo inferior al valor crítico F de 4,413873; con un valor $p > 0,05$, donde los resultados indican que los valores de las réplicas de los duplicados de la medición de ácido láctico en el experimento realizado por los

analistas no varían significativamente entre sí, lo que se puede deducir que no existe efecto en la repetibilidad del proceso. Para confirmar la aseveración propuesta anteriormente se la relaciona con el valor del Lr el cual es 0.010.

En la Tabla 4-10 se reportan valores de los resultados, en los que se demuestran que los valores de las réplicas del experimento realizados por los analistas 1 y 2 no varían significativamente entre sí, pudiéndose deducir que no existe efecto en la reproducibilidad del proceso. Para confirmar esta aseveración se relaciona este análisis estadístico con el valor LR (0,012).

Tabla 4-8 Data de Acidez en Leche Entera Mt.1

ACIDEZ EN LECHE			
Matriz		Leche entera "MT. 1"	
(m/v %)			
	ANL 1	ANL 2	
1	0,141	0,145	
2	0,141	0,141	
3	0,137	0,139	
4	0,141	0,141	
5	0,141	0,136	
6	0,132	0,143	
7	0,141	0,136	
8	0,137	0,141	
9	0,132	0,146	
10	0,132	0,141	
Promedio	0,138	0,141	Promedio Total 0,139
Desv. Est.	0,004	0,003	
C.V.	2,994	2,353	
Sr	0,0037	CVr	2,68
S²L	0,0000	CVR	3,08
SR	0,0043		

Autor: Propio

Tabla 4-9 ANOVA de data de Acidez en Leche Entera Mt.1

Análisis de varianza de un factor
--

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	10	1,375	0,1375	1,6944E-05
Columna 2	10	1,409	0,1409	1,0989E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,78E-05	1	5,78E-05	4,1384248	0,056925839	4,413873
Dentro de los grupos	0,0002514	18	1,3967E-05			

Total	0,0003092	19
-------	-----------	----

Autor: Propio

Tabla 4-10 Incertidumbre de Repetibilidad y Reproducibilidad en Leche Entera.

Nivel	Promedio	Sr	Cvr %	Límite de repetibilidad	SR	CVR %	Límite de reproducibilidad	Incertidumbre estándar relativa
Leche Entera	0,139	0,004	2,685	0,010	0,004	3,077	0,012	0,031

Autor: Propio

4.1.6. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad en leche semidescremada.

En la Tabla 4-11 Data de Acidez en Leche Semidescremada Mt.2, manifiesta los valores promediados de la acidez titulable en muestras de leche semidescremada y en la Tabla 4-12 se reporta el análisis de varianza con un valor F de 1,2082192 siendo inferior al valor crítico F de 4,413873; con un valor $p > 0,05$, donde los resultados indican que los valores de las réplicas de los duplicados de la medición de ácido láctico en el experimento realizado por los analistas no varían significativamente entre sí, lo que se puede deducir que no existe efecto en la repetibilidad del proceso. Para confirmar la aseveración propuesta anteriormente se la relaciona con el valor del Lr el cual es 0.004.

En la Tabla 4-13 ANOVA de data de Acidez en Leche Semidescremada Mt.2 se reportan valores de los resultados, en los que se demuestran que los valores de las réplicas del experimento realizados por los analistas 1 y 2 no varían significativamente entre sí, pudiéndose deducir que no existe efecto en la reproducibilidad del proceso. Para confirmar esta aseveración se relaciona este análisis estadístico con el valor LR (0,004).

Tabla 4-11 Data de Acidez en Leche Semidescremada Mt.2

ACIDEZ EN LECHE			
	Matriz	Leche Semidescremada "MT. 2"	
	(m/v %)		
	ANL 1	ANL 2	
1	0,141	0,141	
2	0,143	0,139	
3	0,140	0,141	
4	0,141	0,143	
5	0,142	0,141	
6	0,141	0,143	
7	0,140	0,143	
8	0,139	0,143	
9	0,139	0,139	
10	0,141	0,141	
Promedio	0,141	0,141	Promedio Total 0,141
Desv. Est.	0,001	0,002	
C.V.	0,890	1,116	
Sr	0,0014	CVr	1,01
S²L	0,0000	CVR	1,02
SR	0,0014		

Autor: Propio

Tabla 4-12 ANOVA de data de Acidez en Leche Semidescremada Mt.2

Análisis de varianza de un factor
RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	10	1,407	0,1407	1,56667E-06
Columna 2	10	1,414	0,1414	2,48889E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,45E-06	1	2,45E-06	1,2082192	0,286170044	4,413873
Dentro de los grupos	3,65E-05	18	2,02778E-06			

Total	3,895E-05	19
--------------	-----------	----

Autor: Propio

Tabla 4-13 Incertidumbre de Repetibilidad y Reproducibilidad en Leche Semidescremada.

Nivel	Promedio	Sr	CVr %	Límite de repetibilidad	SR	CVR %	Límite de reproducibilidad	Incertidumbre estándar relativa
Leche Semidescremada	0,141	0,001	1,010	0,004	0,001	1,020	0,004	0,010

Autor: Propio

4.1.7. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad en leche descremada.

En la Tabla 4-14 Data de Acidez en Leche Descremada Mt.3, manifiesta los valores promediados de la acidez titulable en muestras de leche descremada y en la Tabla 4-15 se reporta el análisis de varianza con un valor F de 2,6470588 siendo inferior al valor crítico F de 4,413873; con un valor $p > 0,05$, donde los resultados indican que los valores de las réplicas de los duplicados de la medición de ácido láctico en el experimento realizado por los analistas no varían

significativamente entre sí, lo que se puede deducir que no existe efecto en la repetibilidad del proceso. Para confirmar la aseveración propuesta anteriormente se la relaciona con el valor del Lr el cual es 0.004.

En la Tabla 4-16 ANOVA de data de Acidez en Leche Descremada Mt.3 se reportan valores de los resultados, en los que se demuestran que los valores de las réplicas del experimento realizados por los analistas 1 y 2 no varían significativamente entre sí, pudiéndose deducir que no existe efecto en la reproducibilidad del proceso. Para confirmar esta aseveración se relaciona este análisis estadístico con el valor LR (0,004).

Tabla 4-14 Data de Acidez en Leche Descremada Mt.3

ACIDEZ EN LECHE			
	Matriz	Leche Descremada "MT. 3"	
	(m/v %)		
	ANL 1	ANL 2	
1	0,141	0,145	
2	0,140	0,143	
3	0,139	0,141	
4	0,142	0,141	
5	0,141	0,141	
6	0,142	0,143	
7	0,142	0,141	
8	0,139	0,141	
9	0,143	0,143	
10	0,141	0,141	
Promedio	0,141	0,142	Promedio Total 0,142
Desv. Est.	0,001	0,001	
C.V.	0,946	0,996	
Sr	0,0014	CVr	0,97
S²L	0,0000	CVR	1,05
SR	0,0015		

Autor: Propio

Tabla 4-15 ANOVA de data de Acidez en Leche Descremada Mt.3

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	10	1,41	0,141	1,77778E-06
Columna 2	10	1,42	0,142	0,000002

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5E-06	1	5E-06	2,6470588	0,121119793	4,413873
Dentro de los grupos	3,4E-05	18	1,88889E-06			

Total	3,9E-05	19
-------	---------	----

Autor: Propio

Tabla 4-16 Incertidumbre de Repetibilidad y Reproducibilidad en Leche Descremada.

Nivel	Promedio	Sr	CV _r %	Límite de repetibilidad	SR	CV _R %	Límite de reproducibilidad	Incertidumbre estándar relativa
Leche Descremada	0,142	0,001	0,971	0,004	0,001	1,048	0,004	0,010

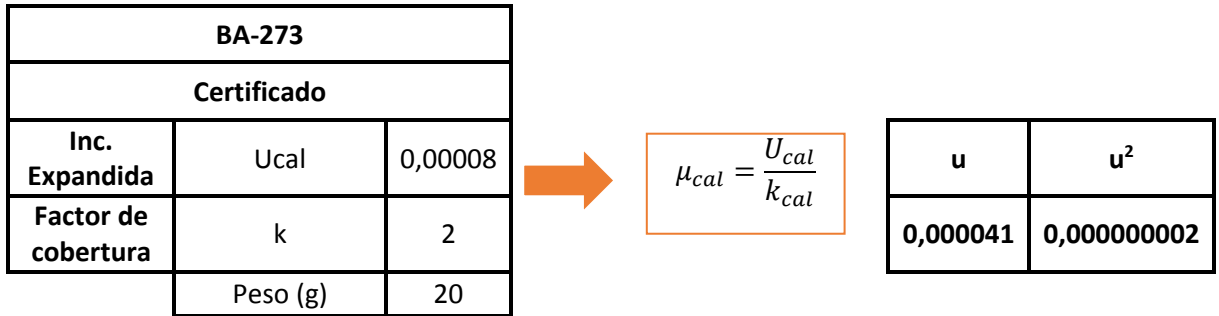
Autor: Propio

4.1.8. Incertidumbre de equipo e instrumento de medición.

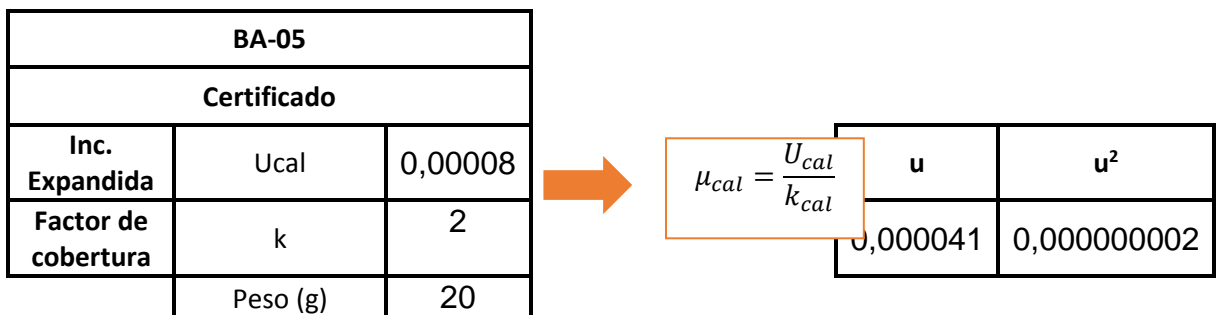
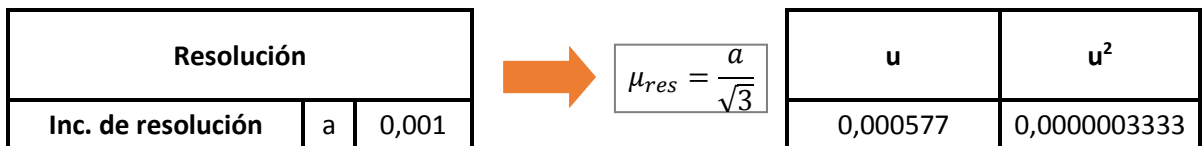
En el presente trabajo de validación se utilizó la balanza analítica como equipo para la toma de muestras en la leche, y la bureta la cual se usó como instrumento de medición para la titular hasta que ocurra la neutralización de la solución; por

tanto, se utilizaron el equipo e instrumento mencionado anteriormente, los cuales influyen directamente a la hora de tomar los resultados, por consiguiente, se debe medir la incertidumbre de cada uno de ellos.

- Incertidumbre de Balanzas utilizadas:



Inc. Expandida	0,000082
----------------	----------



Inc. Expandida	8,20649E-05
----------------	-------------



Inc. de resolución	a	0,001
--------------------	---	-------

0,000577	0,0000003333
----------	--------------

$$\mu_{balanza} = \sqrt{\mu_{cal}^2 + \mu_{resolución}^2}$$



2,89403E-05

Incertidumbre estándar relativa



5,78806E-05

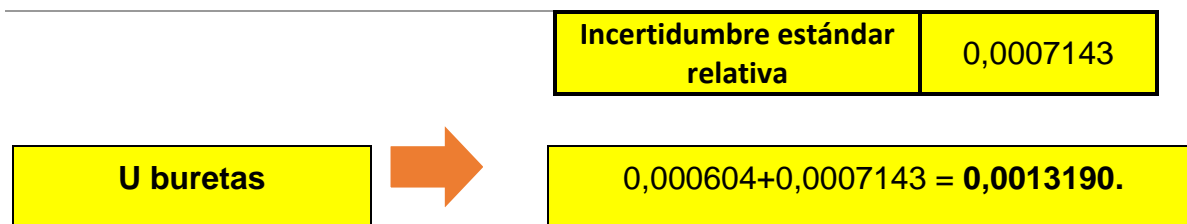
- Incertidumbre de Buretas utilizadas:

Bureta 50 ml

FACTORES DE INFLUENCIA	FACTOR	VALORES	FORMULA	u _i	u _i ²
1.Exactitud del instrumento (ml)	Error máximo permitido	0,05	$\frac{EMP}{\sqrt{3}}$	0,0289	0,000833
2.Temperatura	α	0,00001	$\frac{\alpha \Delta T V_i}{\sqrt{3}}$	0,0014	0,000002
	ΔT	5			
	V _i	50			
3.Precision	μ	0,0089	$\mu = \frac{s}{\sqrt{n}}$	0,0089	0,000079
Incertidumbre estándar					0,0302352
Incertidumbre estándar relativa					0,0006047

Bureta 25 ml

FACTORES DE INFLUENCIA	FACTOR	VALORES	FORMULA	u _i	u _i ²
1.Exactitud del instrumento (ml)	Error máximo permitido	0,03	$\frac{emp}{\sqrt{3}}$	0,0173	0,000300
2.Temperatura	α	0,00001	$\frac{\alpha \Delta T V_i}{\sqrt{3}}$	0,0007	0,000001
	ΔT	5			
	V _i	25			
3.Precision	μ	0,0043	$\mu = \frac{s}{\sqrt{n}}$	0,0043	0,000018
Incertidumbre estándar					0,0178583



4.1.9. Exactitud.

El análisis de exactitud se realizó empleando una prueba interlaboratorio con identificación PT-CH-56 perteneciente a la ronda 291. Los datos primarios se encuentran en los cuadernos de análisis de la prueba interlaboratorio.

En los Anexos D se pueden observar los resultados obtenidos dentro de la participación con toda la información más detallada, sin embargo, en la Tabla 4-17 se especifica la información más importante con lo que respecta a la exactitud del presente trabajo experimental.

Al analizar la data, se observa la acidez titulable obtenida por los 2 analistas, en el cual se encuentra dentro del valor asignado de 0,17%, con una recuperación del 80 a 120%, y con un valor de Incertidumbre de Exactitud de 0,01560.

Tabla 4-17 Incertidumbre de la Exactitud (Recuperación) en Prueba Interlaboratorio.

ACIDEZ EN LECHE			
Muestra		Prueba Interlaboratorio 315	
Valor asignado: 0,17%			
ANL. 1	Recuperación	ANL. 2	Recuperación
0,1483	87,24	0,1529	89,94
0,1417	83,35	0,1484	87,29
Promedio	85,29	Promedio	88,62
Desv. Est.	2,75	Desv. Est.	1,87

Promedio Exactitud	86,96
uExactitud	1,36
Inc. Est. Relativa	0,01560

Autor: Propio

4.1.10. Incertidumbre Combinada.

Dentro del análisis de incertidumbre los valores más relevantes para el estudio son la incertidumbre combinada. Durante el análisis se identificaron algunas fuentes de incertidumbre analizadas en anteriores apartados, asociadas a la medición, peso de muestra, pruebas de interlaboratorio y posteriormente fueron cuantificadas cada una de las incertidumbres identificadas, utilizando los datos obtenidos en los análisis de laboratorio para la validación de la metodología de Acidez Titulable (Incertidumbre Tipo A) y los valores de certificados de calibración de la balanza y de la bureta que se encuentra disponible en los Anexos XXX y XXXX.

Posteriormente se expresó todas las incertidumbres encontradas como incertidumbres estándar, para lo cual se utilizó un factor de cobertura igual a $k=2$, valor que se lo puede obtener de los certificados de calibración.

A partir de esta información se combinó los componentes de incertidumbre individuales, obteniendo las Tablas 4-18, 4-19 y 4-20 donde se observa la incertidumbre total combinada, luego se realizó el cálculo de la incertidumbre expandida, el cual proporciona el intervalo de confianza en donde se encontró el valor verdadero de determinación de grasa, esto se logró multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura $k=2$ asumiendo una distribución normal de los datos alrededor de la media y una probabilidad del 95 % de contener el valor verdadero.

Para realizar la incertidumbre combinada se requiere formula que se detalla a continuación:

$$\mu_{\text{COMBINADA}} = \sqrt{\mu_R^2 + \mu_{\text{Balanza}}^2 + \mu_{\text{Bureta}}^2 + \mu_{\text{Exactitud}}^2}$$

La fórmula descrita engloba las incertidumbres de los análisis realizados, la incertidumbre de la balanza, la incertidumbre de la bureta y la incertidumbre de la exactitud realizada por la prueba interlaboratorio, para cada uno de los puntos a medir, dando como resultados:

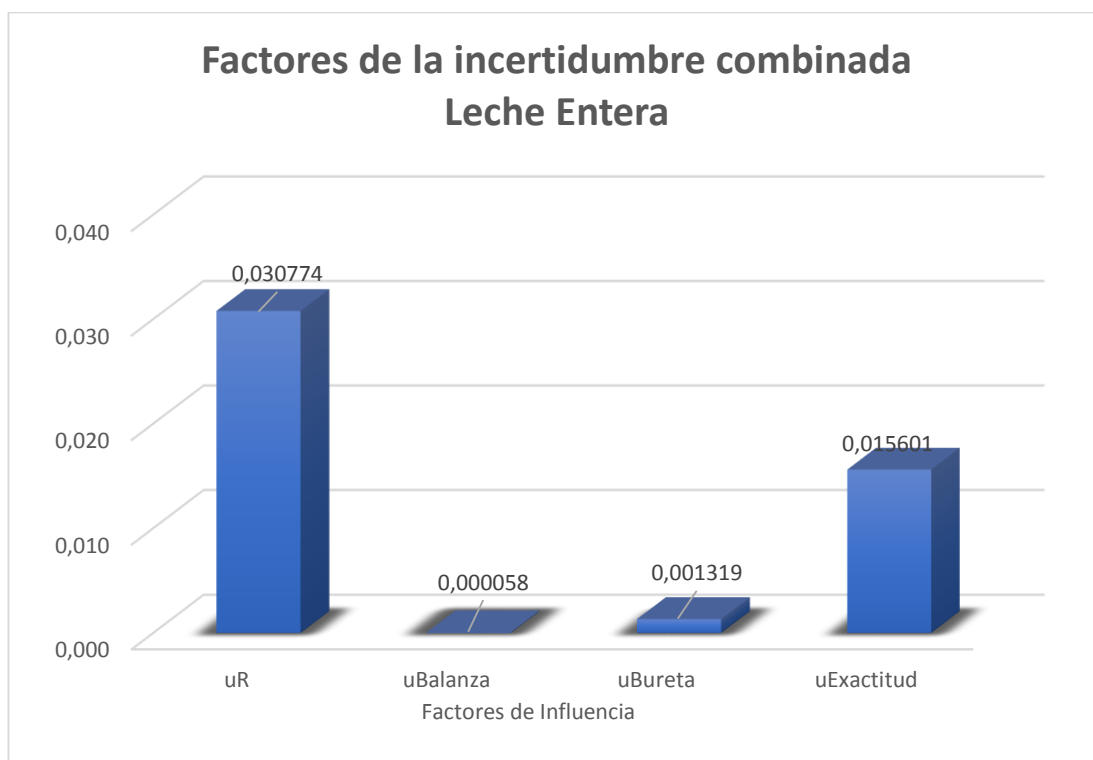
- Leche Entera

Tabla 4-18 Incertidumbre combinada Matriz Leche Entera

Leche Entera		\bar{x}	0,139
Factores de Influencia	u_i	u_i^2	
uR	0,030774	0,000947017	
uBalanza	0,000058	0,00000000	
uBureta	0,001319	1,73986E-06	
uExactitud	0,015601	0,00024341	
Total		0,00119	
u		0,03453	
X(u)		0,00481	
U		0,00961	K=2
%		6,91	

Autor: Propio

Figura 4-2 Factores de Incertidumbre Combinada Leche Entera



Autor: Propio

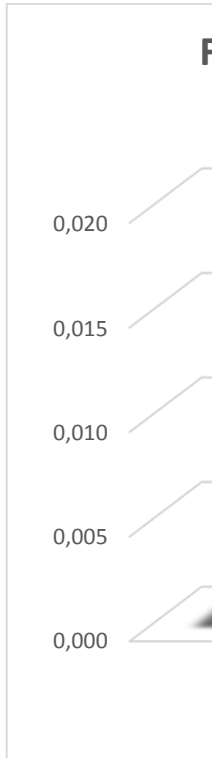
- Leche Semidescremada

Tabla 4-19 Incertidumbre combinada Matriz Leche Semidescremada

Leche Semidescremada		\bar{x}	0,141
Factores de Influencia	u_i	u_i^2	

Autor: Propio

Figura 4-3
incertidumbre



uR	0,010200	0,00010405
uBalanza	0,000058	0,00000000
uBureta	0,001319	1,73986E-06
uExactitud	0,015601	0,00024341
Total		0,00035
u		0,01869
X(u)		0,00264
U		0,00527
%		3,74

Factores de la
combinada

K=2

Autor: Propio

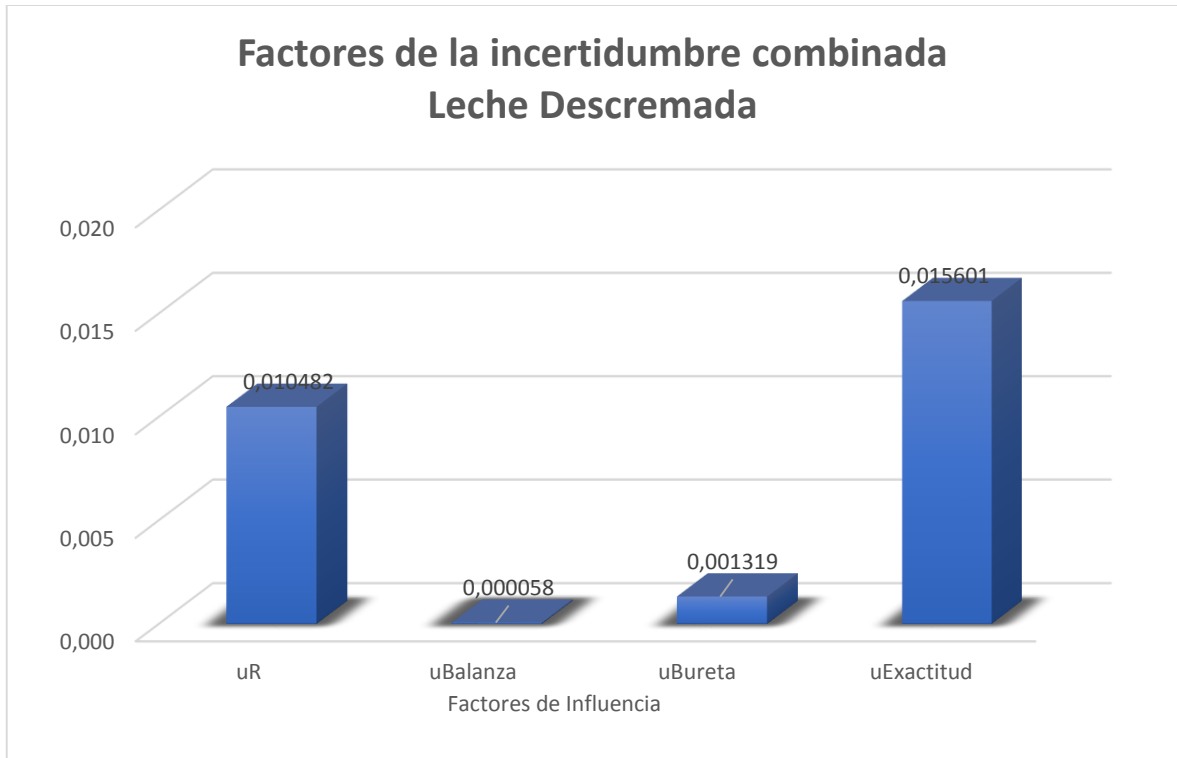
- Leche Descremada

Tabla 4-20 Incertidumbre combinada Matriz Leche Descremada

Leche Descremada		\bar{x}	0,142
Factores de Influencia	u_i	u_i²	
uR	0,010482	0,000109878	
uBalanza	0,000058	0,00000000	
uBureta	0,001319	1,73986E-06	
uExactitud	0,015601	0,00024341	
	Total	0,00036	
	u	0,01884	
	X(u)	0,00267	
	U	0,00533	K=2
	%	3,77	

Autor: Propio

Figura 4-4 Factores de la incertidumbre combinada Leche Descremada



Autor: Propio

4.1.11. Robustez

La robustez es uno de los parámetros que se exigen durante el desarrollo del protocolo de validación e indica la susceptibilidad del método analítico a variaciones menores razonables y brinda una indicación de su confiabilidad en el desarrollo de la experimentación.

Las condiciones normales según las Normativas vigentes que rigen en la Industria alimentaria para la acidez titulable en la leche son en los siguientes parámetros descritos en la subsecuente tabla:

Tabla 4-21 Condiciones y parámetros para el análisis de Acidez Titulable.

MASA DE MUESTRA	CANTIDAD AGUA	FENOLFTALEÍNA	TEMPERATURA
20 g	40 g (40 mL debido a la densidad del H ₂ O=1kg/m ³)	5 gotas	20°C

Autor: Propio

Para aplicar robustez en los análisis se realizaron modificaciones en la masa de la muestra problema, los mililitros que se adicionan con agua, la cantidad que se adiciona la fenolftaleína y por último la temperatura la cual debe estar la muestra, las modificaciones se las indican en el siguiente recuadro donde se evidencia la variabilidad de la validación de la acidez en leche los cuales están sombreados para su mejor identificación.

Tabla 4-22 Variabilidad de procedimiento para Robustez.

IDENTIFICACIÓN	MASA DE MUESTRA	CANTIDAD AGUA	FENOLFTALEÍNA	TEMPERATURA
MUESTRA R1	20 g	40 ml	5 gotas	20°C
MUESTRA R2	15 g	40 ml	5 gotas	20°C
MUESTRA R3	25 g	40 ml	5 gotas	20°C
MUESTRA R4	20 g	50 ml	5 gotas	20°C
MUESTRA R5	20 g	30 ml	5 gotas	20°C
MUESTRA R6	20 g	40 ml	5 gotas	20°C
MUESTRA R7	20 g	40 ml	2 gotas	20°C
MUESTRA R8	20 g	40 ml	10 gotas	20°C
MUESTRA R9	20 g	40 ml	5 gotas	15°C
MUESTRA R10	20 g	40 ml	5 gotas	25°C

Autor: Propio

Luego de realizar las modificaciones a las condiciones normales para realizar los análisis respectivos, en la Tabla 4-23 se detallan los resultados de cada una de las muestras con los cambios respectivos, las cuales presentan una variación prominente con respecto a los resultados reales y con las condiciones indicadas por los Procedimientos Legales de Regulación, las cuales serán representados en gráficos a continuación.

Tabla 4-23 Resultados con modificaciones para verificar robustez.

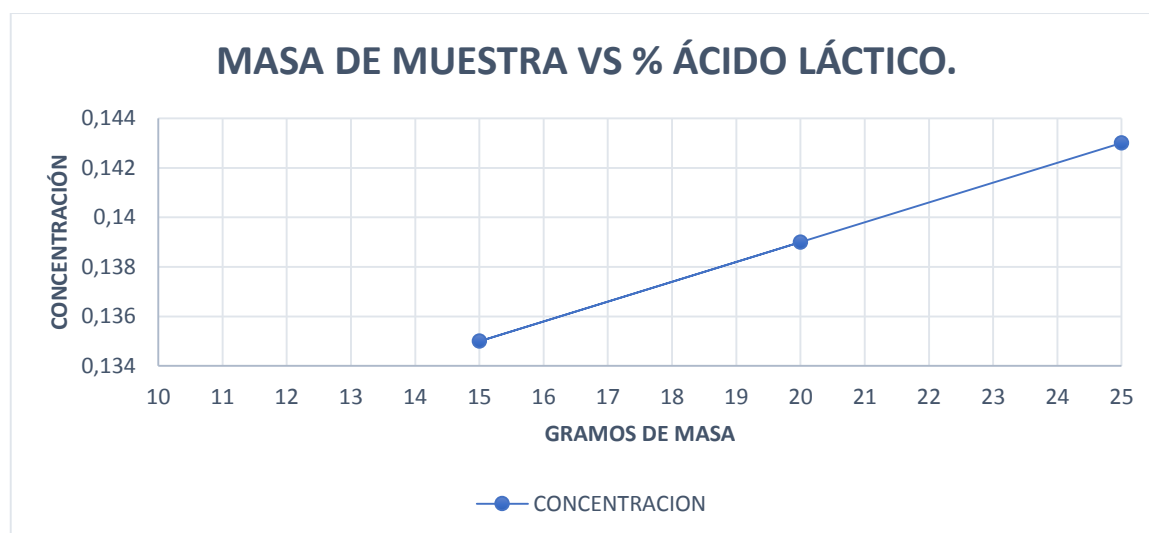
NORMALIDAD DE NAOH	0,098	FACTOR	0,090
---------------------------	-------	---------------	-------

MUESTRA	VOLUMEN	MASA DEL MATRAZ CON MUESTRA	MASA DE MATRAZ	PESO MUESTRA	FORMULA
MUESTRA R1	3,17	129,4802	109,4004	20,0798	0,139
MUESTRA R2	2,3	137,1744	122,1353	15,0391	0,135
MUESTRA R3	4,05	150,0574	125,0518	25,0056	0,143
MUESTRA R4	2,95	144,1982	124,154	20,0442	0,130
MUESTRA R5	3,15	126,5514	106,5366	20,0148	0,139
MUESTRA R6	3,15	136,5106	116,4863	20,0243	0,139
MUESTRA R7	3,45	140,9264	120,9115	20,0149	0,152
MUESTRA R8	2,75	138,8212	118,8003	20,0209	0,121
MUESTRA R9	2,9	142,1416	122,0691	20,0725	0,127
MUESTRA R10	3,1	128,0289	108,003	20,0259	0,137

Autor: Propio

En la imagen 4-5, nos demuestra la variabilidad que presenta el resultado del porcentaje del ácido láctico con respecto al aumento o disminución de la cantidad de masa de muestra, en la que presenta una curva ascendente, indicando que, a mayor masa de muestra, mayor concentración de ácido láctico.

Figura 4-5 Masa de Muestra vs Concentración de Acidez.



Autor: Propio

En la imagen 4-6, representa la variabilidad que exhibe el porcentaje del ácido láctico con respecto al aumento o disminución de la cantidad de agua a la

muestra, en la que presenta una curva decreciente, indicando que, a mayor cantidad de agua, menor concentración de ácido láctico.

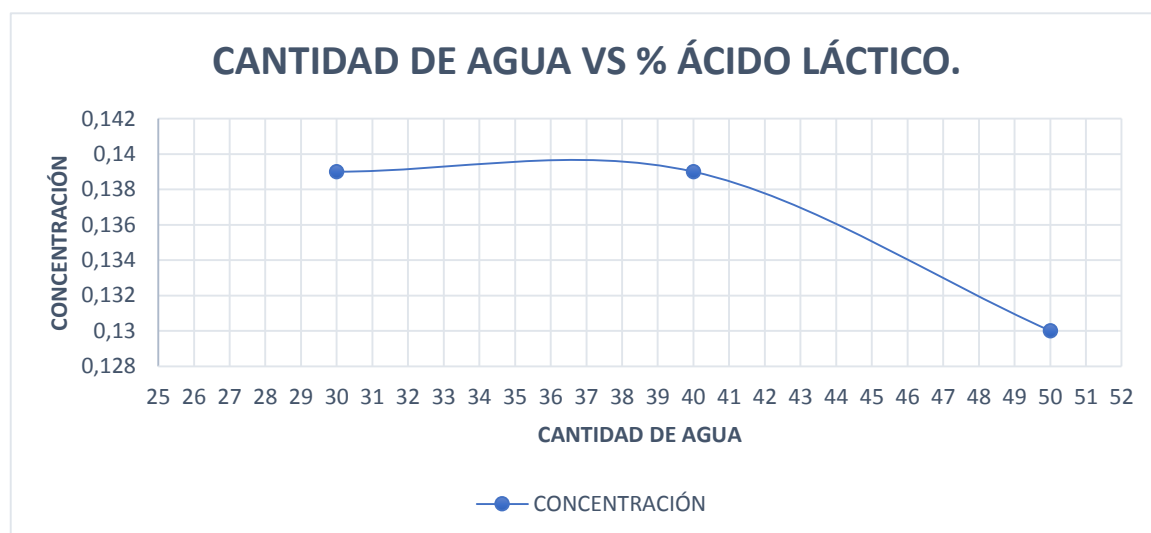
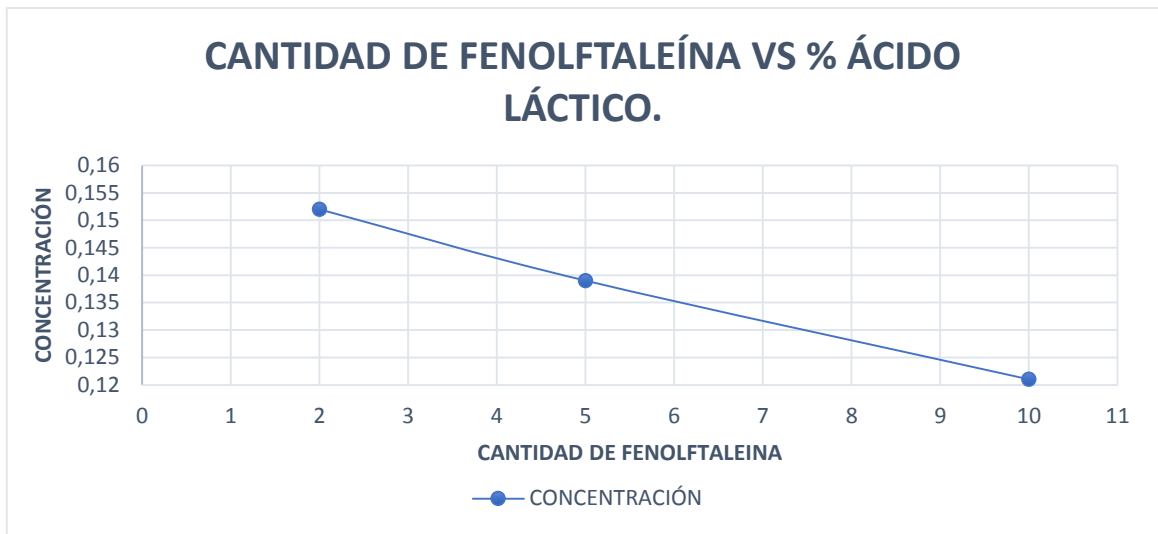


Figura 4-6 Cantidad de Agua vs Concentración de Acidez.

Autor: Propio

En la imagen 4-7, nos representa la inestabilidad que presenta el resultado del porcentaje del ácido láctico con respecto al aumento o disminución de la cantidad de indicador de fenolftaleína, se demuestra una curva levemente decreciente, demostrando que existe una ligera variación al momento de analizar la acidez titulable en muestras lácteas.

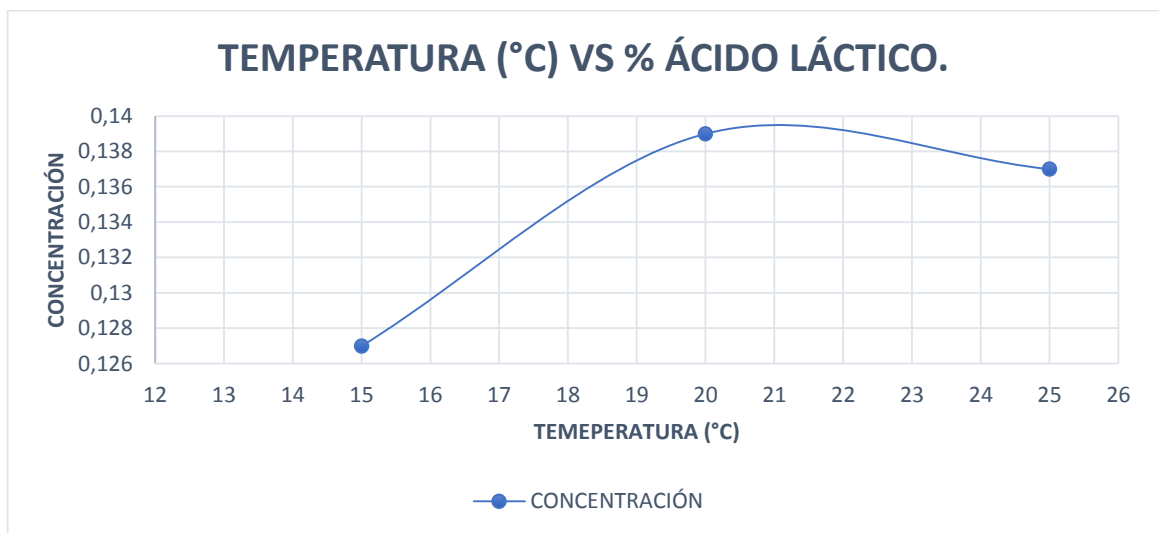
Figura 4-7 Fenolftaleína vs Concentración de Acidez.



Autor: Propio

En la imagen 4-8, nos representa los cambios que exhibe el resultado del porcentaje del ácido láctico con respecto al aumento o disminución de temperatura en la muestra a analizar, se demuestra una curva ascendente y posterior decreciente, demostrando que existe una variación significativa al momento de analizar la acidez en muestras de leche.

Figura 4-8 Temperatura vs Concentración de Acidez.



Autor: Propio

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En el presente estudio se permitió la ejecución de una validación un método analítico para laboratorio a fin de la determinación de acidez en muestras de leches, mediante la técnica de titulación, en el que ocurre una reacción ácido-base, hasta neutralización con los ácidos presentes y disueltos en la muestra problema, en el que se evidencia la reacción mediante un cambio o viraje de color característico.

Después de realizar y efectuar estadísticamente los resultados de análisis obtenidos, nos permiten arribar las subsecuentes conclusiones:

Se realizó el diseño de la esquema de validación en función a los niveles de muestras que ingresan periódicamente en los últimos años para los respectivos análisis de muestras de productos lácteos, en la que se incluye el parámetro de acidez titulable, el cual es un requisito para la comercialización y dispensación a nivel de territorio nacional, donde se demostró que las muestras de Leche Larga Vida o leches UHT en los tipos Entera, Semidescremada y Descremada, son las más estudiadas y analizadas durante los últimos años. Al mismo modo se consideró los parámetros establecidos en la Norma INEN/NTE 701:2009 para las Leches Larga Vida.

Para ello se estimó la repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, incertidumbre combinada y expandida, con un factor de cobertura de $k=2$, cumpliendo con el diseño de validación analizándose las 3 matrices de leches UHT por 5 días con dos analistas diferentes.

En el caso de Robustez, presento interferencias sustanciales debido al limitado rango de porcentaje permitido de ácido láctico en muestras de leche, al momento de intercambiar la metodología, por lo que se vio afectado los resultados finales al momento de procesar las muestras.

Para finalizar, la metodología propuesta demostró repetibilidad, reproducibilidad y exactitud inferiores a los propuestos en el diseño de la metodología.

5.2. Recomendaciones

Al momento de realizar los análisis correspondientes, se sugiere considerar las leches que presentan saborizantes y/o fortificadas para verificar el parámetro de acidez titulable.

Se recomienda investigar las reacciones químicas del ácido láctico frente a los parámetros de robustez propuesto, a fin de determinar su comportamiento a diferentes condiciones expuestas.

CAPITULO 6

6. Referencias

- [1] H.-A. JURADO-GÁMEZ, D.-A. QUITIAQUEZ-MONTENEGRO, L.-C. MUÑOZ-DOMÍNGUEZ, H.-A. JURADO-GÁMEZ, D.-A. QUITIAQUEZ-MONTENEGRO, and L.-C. MUÑOZ-DOMÍNGUEZ, “Valoración de calidad composicional, sanitaria, y microbiológica de leche cruda en diferentes tercios de lactancia,” *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 19, no. 2, pp. 147–157, Mar. 2021, doi: 10.18684/BSAA.V19.N2.2021.1675.
- [2] K. R. Taco and P. García-Godos, “Optimización de parámetros para la elaboración de leche ácida con *Lactobacillus acidophilus*,” *Información tecnológica*, vol. 32, no. 1, pp. 179–186, 2021, doi: 10.4067/S0718-07642021000100179.
- [3] H. J. Paz-Díaz *et al.*, “Effect of process variables on the physicochemical and rheological properties of yogurt,” *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 24, no. 1, Jun. 2021, doi: 10.31910/RUDCA.V24.N1.2021.1922.
- [4] E. Ionita, “La producción de leche en Ecuador,” 2022. <https://www.veterinariadigital.com/articulos/la-produccion-de-leche-en-ecuador/> (accessed Sep. 10, 2022).
- [5] Julijana Tomovska, Nikola Gjorgievski, and Borche Makarijoski, “Examination of pH, Titratable Acidity and Antioxidant Activity in Fermented Milk,” *J Mater Sci Eng A*, vol. 6, no. 6, Dec. 2016, doi: 10.17265/2161-6213/2016.11-12.006.
- [6] A. ; Agudelo and O. Bedoya Mejía, “Composición nutricional de la leche de ganado vacuno,” *Rev Lasallista Investig*, vol. 2, no. 1, pp. 38–42, 2005, Accessed: Jun. 14, 2022. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
- [7] Instituto Ecuatoriano de Normalización, “Leche Cruda. Requisitos,” 2012.
- [8] C. Alimentarius Autor, “Definiciones de Leche y Queso,” 2018, Accessed: Sep. 11, 2022. [Online]. Available: <http://bcn.cl/22oic>

- [9] W. v. Engelhardt and G. Breves, "Fisiología veterinaria," 2005, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: https://www.editorialacribia.com/libro/fisiologia-veterinaria_54451/
- [10] INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN, "Leche Larga Vida. Requisitos.," 2012.
- [11] M. V. Mendoza Cedeño, "Evaluación de la Calidad y Estabilidad a tres marcas de Leches Ultrapasteurizadas, envasada en Fundas de Polietileno.," 2016, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12941>
- [12] C. Alimentarius Autor, "Definiciones de Leche y Queso," 2018, Accessed: Sep. 11, 2022. [Online]. Available: <http://bcn.cl/22oic>
- [13] INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN, "LECHE PASTEURIZADA. REQUISITOS."
- [14] INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN, "LECHE PASTEURIZADA. REQUISITOS.," 2012.
- [15] D. Gómez, "DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRASA LÁCTEA EN LECHE ENTERAS RECONSTITUIDAS EMPACADAS EN BOLSA PLÁSTICA DISTRIBUIDAS EN SUPERMERCADOS DE LA CIUDAD DE GUATEMALA' ," UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA , Guatemala, 2006.
- [16] D. Juca, C. Patricia Pérez, and P. Página, "Determinación de lactosa en leche deslactosada y su comparación con la fórmula aplicada en la empresa de Lácteos San Antonio," 2010, Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2427>
- [17] A. T. de Freitas, Z. Durán, and C. Rodríguez, "ACIDEZ TITULABLE COMO CONTROL DE CALIDAD PARA LA LECHE HUMANA," *Arch Venez Pueric Pediatr*, vol. 72, no. 3, pp. 92–96, 2009, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=367936950004>
- [18] Julijana Tomovska, Nikola Gjorgievski, and Borche Makarijoski, "Examination of pH, Titratable Acidity and Antioxidant Activity in Fermented Milk," *J Mater Sci Eng A*, vol. 6, no. 6, Dec. 2016, doi: 10.17265/2161-6213/2016.11-12.006.

- [19] M. V. González Cuascota, “Estudio del punto crioscópico de leche cruda bovina, en dos pisos altitudinales y dos épocas del año, Ecuador 2012,” 2013, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6050>
- [20] M. V. Mendoza Cedeño, “Evaluación de la Calidad y Estabilidad a tres marcas de Leches Ultrapasteurizadas, envasada en Fundas de Polietileno.,” 2016, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12941>
- [21] Julijana Tomovska, Nikola Gjorgievski, and Borche Makarijoski, “Examination of pH, Titratable Acidity and Antioxidant Activity in Fermented Milk,” *J Mater Sci Eng A*, vol. 6, no. 6, Dec. 2016, doi: 10.17265/2161-6213/2016.11-12.006.
- [22] M. V. González Cuascota, “Estudio del punto crioscópico de leche cruda bovina, en dos pisos altitudinales y dos épocas del año, Ecuador 2012,” 2013, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6050>
- [23] C. de Bioquímica and Y. Farmacia, “Calibración y validación del equipo milkoscan FT1 para la determinación de parámetros fisicoquímicos en leche cruda en la Industria de Lácteos San Antonio C.A.,” 2015, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/21765>
- [24] J. C. Pardo Jiménez, “Evaluación de la calidad organoléptica y físico - química de la leche bovina en el cantón Quilanga,” Oct. 2019, Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: <https://dspace.unl.edu.ec/handle/123456789/22527>
- [25] R. Vargas-Uscategui, A. Arenas-Clavijo, and J. S. Ramírez-Navas, “Efecto del proceso de acidificación sobre el color de queso cottage,” *Agronomy Mesoamerican*, vol. 28, no. 3, pp. 677–690, Sep. 2017, doi: 10.15517/MA.V28I3.22876.
- [26] C. G. León Molina and N. E. Proaño Bone, “Elaboración del yogurt a partir de diferentes materias primas, como leche de vaca y de cabra para su caracterización,” 2015, Accessed: Sep. 11, 2022. [Online]. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/26492>

- [27] M. González, “ESTUDIO DEL PUNTO CRIOSCOPICO DE LECHE CRUDA BOVINA”.
- [28] I. M. Alcocer Villacís, “El proceso de ordeño manual de la leche de vaca y su incidencia en la contaminación microbiológica,” 2008, Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/3405>
- [29] " Evaluación, D. P. Nutritivo, Y. N. De, S. Esther, and V. Guevara, “Evaluación del Potencial Nutritivo y Nutracéutico de Galletas Elaboradas con Amaranto (*Amaranthus caudatus*) y Tomate (*Solanum betaceum*) Deshidratado como Colorante y Saborizante,” 2013, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2581>
- [30] O. J. McCarthy and H. Singh, “Physico-chemical properties of milk,” *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 3, pp. 691–758, 2009, doi: 10.1007/978-0-387-84865-5_15.
- [31] A. C. Villalobos, “Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada,” *Agronomy Mesoamerican*, vol. 17, no. 1, pp. 55–61, Aug. 2006, doi: 10.15517/AM.V17I1.5066.
- [32] Maciej Serda *et al.*, “Química y Física Lactológica.,” *Uniwersytet śląski*, vol. 7, no. 1, pp. 343–354, 1986, doi: 10.2/JQUERY.MIN.JS.
- [33] F. G. O. OLIVAREZ, “Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo,” 2011.
- [34] S. Saavedra Bocanegra, “Producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus* sp aislado de frutos de la Región Loreto,” *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 2017, Accessed: Sep. 12, 2022. [Online]. Available: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16831>
- [35] Q. F. María, S. Ríos, T. Q. F. Claudio, and B. Morales, “Validación de procesos”.
- [36] U. Guía, V. P. Barwick LGC Pedro Morillas Bravo, S. L. R Ellison, and E. L. F Gjengedal, “Guía Eurachem La Adecuación al Uso de los Métodos

- Analíticos Primera Edición Española Agradecimientos Grupo del proyecto”, Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: www.eurachem.org
- [37] M. Feinberg and M. Laurentie, “A global approach to method validation and measurement uncertainty. Accreditation and Quality Assurance, 11(1-2), 3–9 | 10.1007/s00769-005-0081-9.” <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1007/s00769-005-0081-9> (accessed Sep. 16, 2022).
- [38] “Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment.” <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidance-for-the-validation-of-analytical-methodology-and-calibration-of-equipment.html> (accessed Sep. 16, 2022).
- [39] L. Arias, “Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina A,” 2014. Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: [https://www.google.com/search?q=Arias+Gonzalez%2C+L.+M.+\(2014\).+Validaci%C3%B3n+de+un+m%C3%A9todo+anal%C3%ADtico+para+la+cuantificaci%C3%B3n+de+vitamina+A+Tesis-Luisa+Mar%C3%ADa+Arias+Gonz%C3%A1lez.+Retrieved+from+http%3A%2F%2Fbiblio3.url.edu.gt%2FTesario%2F2014%2F02%2F02%2FArias-Luisa.pdf&rlz=1C1CHBD_esEC839EC839&oq=Arias+Gonzalez%2C+L.+M.+\(2014\).+Validaci%C3%B3n+de+un+m%C3%A9todo+anal%C3%ADtico+para+la+cuantificaci%C3%B3n+de+vitamina+A+Tesis-Luisa+Mar%C3%ADa+Arias+Gonz%C3%A1lez.+Retrieved+from+http%3A%2F%2Fbiblio3.url.edu.gt%2FTesario%2F2014%2F02%2F02%2FArias-Luisa.pdf&aqs=chrome.0.69i59.245j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=Arias+Gonzalez%2C+L.+M.+(2014).+Validaci%C3%B3n+de+un+m%C3%A9todo+anal%C3%ADtico+para+la+cuantificaci%C3%B3n+de+vitamina+A+Tesis-Luisa+Mar%C3%ADa+Arias+Gonz%C3%A1lez.+Retrieved+from+http%3A%2F%2Fbiblio3.url.edu.gt%2FTesario%2F2014%2F02%2F02%2FArias-Luisa.pdf&rlz=1C1CHBD_esEC839EC839&oq=Arias+Gonzalez%2C+L.+M.+(2014).+Validaci%C3%B3n+de+un+m%C3%A9todo+anal%C3%ADtico+para+la+cuantificaci%C3%B3n+de+vitamina+A+Tesis-Luisa+Mar%C3%ADa+Arias+Gonz%C3%A1lez.+Retrieved+from+http%3A%2F%2Fbiblio3.url.edu.gt%2FTesario%2F2014%2F02%2F02%2FArias-Luisa.pdf&aqs=chrome.0.69i59.245j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8)
- [40] B. Castillo and R. González, “Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos”, Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009
- [41] FDA, “Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry | FDA,” 2021. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry> (accessed Sep. 16, 2022).

- [42] “ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95) APPROVAL BY CPMP November 1994 DATE FOR COMING INTO OPERATION,” 1995, Accessed: Sep. 16, 2022. [Online]. Available: <http://www.emea.eu.int>

CAPÍTULO 7

7. Apéndices y anexos

ANEXO A. Certificado de Análisis del Hidróxido de Sodio

Certificate of Analysis
ThermoFisher
 SCIENTIFIC

Page 1 of 1

Certificate of Analysis

1 Reagent Lane
 Fair Lawn, NJ 07410
 201.796.7100 tel
 201.796.1329 fax
 Thermo Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System
 Standard ISO9001:2015 by SAI Global Certificate Number CERT - 0120632

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator and end user to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The following information is the actual analytical results obtained.

Catalog Number	S318	Quality Test / Release Date	10/16/2019
Lot Number	194670		
Description	SODIUM HYDROXIDE, A.C.S.		
Country of Origin	United States	Suggested Retest Date	Oct/2024
Chemical Origin	Inorganic		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

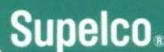
N/A			
Result Name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	White pellets
ASSAY	%	>= 97.0	98.8
CALCIUM	%	<= 0.005	<0.005
CHLORIDE	%	<= 0.005	<0.005
HEAVY METALS (as Ag)	%	<= 0.002	<0.002
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	pass test
IRON (Fe)	%	<= 0.001	<0.001
MAGNESIUM	%	<= 0.002	<0.002
MERCURY (Hg)	ppm	<= 0.1	<0.1
NICKEL (Ni)	%	<= 0.001	<0.001
NITROGEN COMPOUNDS	%	<= 0.001	<0.001
PHOSPHATE (PO4)	%	<= 0.001	<0.001
POTASSIUM (K)	%	<= 0.02	<0.02
SODIUM CARBONATE	%	<= 1.0	0.61
SULFATE (SO4)	%	<= 0.003	<0.003



Julian Burton - Quality Control Manager - Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above.
 If there are any questions with this certificate, please call at (800) 227-6701.
 *Based on suggested storage condition.

ANEXO B. Certificado de Análisis del Ftalato Acido de Potasio



www.sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

Certipur® Potassium hydrogen phthalate



Product no.: 1.02400.0080
Lot no.: 192400D
Description of CRM: Potassium hydrogen phthalate
Expiry date: 2024/05/31
Storage: +15°C to +25°C tightly closed in the original container and protect from light and moisture
Composition: Potassium hydrogen phthalate

Analyte	Certified value as mass fraction	Associated uncertainty, $U=k \cdot u$ ($k=2$) as mass fraction
Mass fraction	99.92 %	±0.07 %

Metrological traceability: Directly traceable to the suitable primary standard NIST SRM Potassium hydrogen phthalate 84L.

Measurement method: The certified mass fraction was determined by potentiometric titration with sodium hydroxide as titration solution. The certified value is based on a molecular mass $M = 204.222$ g/mol dried substance.

Intended use: This volumetric standard is intended for standardisation of volumetric solutions in accordance to the chapter reagents of the Pharmacopoeia (Ph. Eur., USP).

Instructions for handling and correct use: The volumetric standard Potassium hydrogen phthalate must be dried at 120 °C for 2 hours before use. By within-unit homogeneity studies a minimum weigh-in quantity of 175 mg was determined.

Accreditation: Merck KGaA, Darmstadt, Germany is accredited by the German accreditation authority DAkkS as registered reference material producer D-RM-15185-01-00 in accordance with ISO 17034 and registered calibration laboratory D-K-15185-01-00 according to DIN EN ISO/IEC 17025.

Certificate issue date: 2019/07/04



A. Yildirim

Dipl.-Ing. Ayfer Yildirim
(Responsible QC Laboratory Manager)



Health and safety information:

Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

Certification process details:

Certipur® Volumetric standards are prepared from high purity salts. Characterisation of Certipur® Volumetric standards is carried out by the accredited quality control (QC) laboratory at Merck KGaA, Darmstadt, Germany according to DIN EN ISO / IEC 17025 by measuring the mass fraction by potentiometric titration.

Homogeneity and stability studies are performed with the material according to the requirements of ISO 17034 and ISO Guide 35.

Associated uncertainty:

The associated uncertainty U_{CRM} reported with the certified values is calculated as combined expanded uncertainty $U_{CRM}=k \cdot u_{CRM}$ in accordance with GUM and EA-4/02, with $k=2$ as the coverage factor for a 95% coverage probability.

The combined uncertainty u_{CRM} is derived from combination of the squared uncertainty contributions:

$$u_{CRM} = \sqrt{u^2_{\text{Characterisation}} + u^2_{\text{Homogeneity}} + u^2_{\text{Stability}}}$$

$u_{\text{characterisation}}$:

is the uncertainty in accordance with DIN EN ISO/IEC 17025 which includes the contributions of the primary reference material and the measuring system.

$u_{\text{homogeneity}}$:

is the between-bottle variation in accordance with ISO 17034. The assessment of homogeneity is performed by analysis of a representative number of systematically chosen sample units.

$u_{\text{stability}}$:

is the uncertainty obtained from short-term and long-term stability in accordance with ISO 17034. The stability studies are the basis for the quantification of the expiry date of this volumetric standard for the unopened bottle.

For more detailed information please read the certification report on our website.

Certificate of analysis revision history:

Certificate version	Date	Reason for version
01	2019/07/04	Initial version

The vibrant M, Supelco, Aquastar and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.
© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.



ANEXO C. EVIDENCIA DE ANÁLISIS EN LABORATORIO







Dairy Chemistry (QDCS) Individual Report

CH315 Round 315

CH3692 - ARCSA

Issue Number: 1

Issued: 31/08/2022



LGC Proficiency Testing

1 Chamberhall Business Park | Chamberhall Green | Bury |
United Kingdom | BL9 0AP

-

Analyte: Titratable Acidity

Results

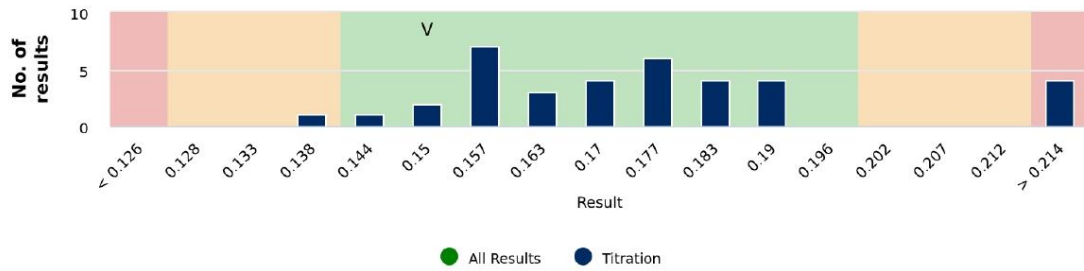
Sample	Method	Result	Unit	Perf Score	Score Type	% Diff
56	Titration	0.148	% Lactic acid	-1.48	zScore	12.941

Assessment Statistics

Sample	56
Assigned Value	0.170
Assigned Value Derived By	All data
Uncertainty of Assigned Value	0.0032
SDPA	0.0148
Satisfactory Range	0.14 to 0.2
Satisfactory z/z score	86.1%
Questionable z/z score	2.8%
Unsatisfactory z/z score	11.1%

Result Statistics

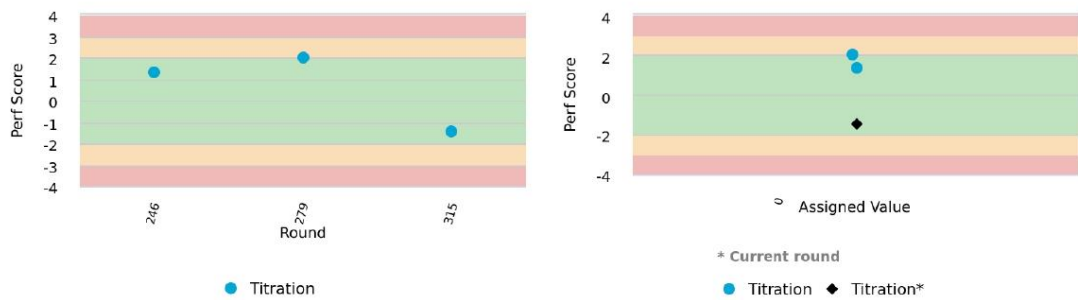
Sample	56
Number of Results	36
Number of Excluded Results	3
Mean	0.170
Median	0.170
Standard Deviation	0.0157
Robust SD	0.0148
min/max	0.140/0.219



Last 9 Performance Scores

Sample 56 - Round	246	279	315
Titration	1.33	2.02	-1.48

< or > = Less/Greater than result returned, no assessment given. ZS = Zero Spiked Sample, no assessment given. Blank = No result submitted

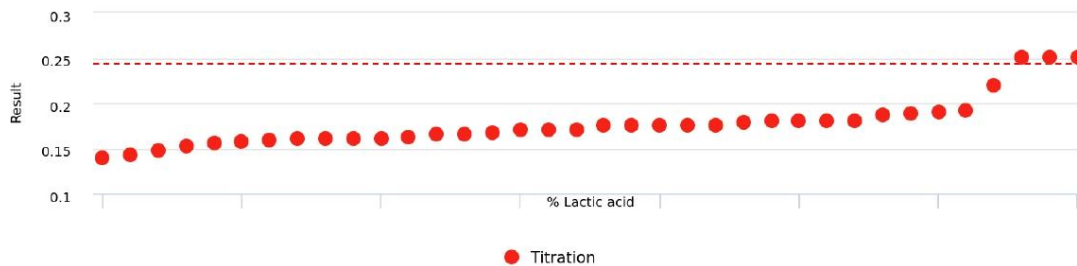


Analyte: Titratable Acidity

Sample 56, Quantitative Methodology Summary

Method	Results			Unit	Median	Robust SD	Range	Sat %	Questionable %	Unsat %
	Number	Excluded	% of Total							
Titration	36	3	100	% Lactic acid	0.170	0.0148	0.140 to 0.219	86.1	2.8	11.1

Sample 56



Results above or below the dotted line are gross errors or blunders truncated for display purposes

Sample Comments

Sample 56

No technical comments available for this sample

37 - Hard Cheese

Analyte	Analyst	Method	Result	Units	Z Score	Assigned Value	Ux AV	SDPA	Exp.SDPA	Number of results	Median	Mean	Robust SD	SD	Your Reference
Fat	Lab Result	Other	30.85	%	-1.09	31.40	0.107	0.5	N/A	52	31.40	31.51	0.593	0.943	Other
Salt	Lab Result	Other	1.18	%	-5.13	1.59	0.014	0.08	N/A	50	1.59	1.59	0.074	0.130	Other
Sodium	Lab Result	AAS	0.69	%	4.14*	0.56	0.010	0.03	0.031	14	0.56	0.57	0.030	0.048	AAS
Moisture	Lab Result	Heating to constant weight	37.37	%	0.82	37	0.080	0.45	N/A	54	37	37.06	0.460	0.585	Heating to constant weight
Moisture	MLL	Heating to constant weight	37.43	%	0.96	37	0.080	0.45	N/A	54	37	37.06	0.460	0.585	Heating to constant weight
Moisture	DSC	Heating to constant weight	37.60	%	1.33	37	0.080	0.45	N/A	54	37	37.06	0.460	0.585	Heating to constant weight
Moisture	ESL	Heating to constant weight	37.07	%	0.16	37	0.080	0.45	N/A	54	37	37.06	0.460	0.585	Heating to constant weight

* Please note, participant performance for this analyte has been assessed using a z' score, rather than a z score, in order to account for the measurement uncertainty of the assigned value which is not negligible when compared to the SDPA.

56 - Milk

Analyte	Analyst	Method	Result	Units	Z Score	Assigned Value	Ux AV	SDPA	Exp.SDPA	Number of results	Median	Mean	Robust SD	SD	Your Reference
Titrateable Acidity	Lab Result	Titration	0.148	% Lactic acid	-1.48	0.170	0.0032	0.0148	N/A	36	0.170	0.170	0.0148	0.0157	Titration
Titrateable Acidity	MLL	Titration	0.160	% Lactic acid	-0.67	0.170	0.0032	0.0148	N/A	36	0.170	0.170	0.0148	0.0157	Titration
Freezing Point Depression	Lab Result	Cryoscope	534.0	m°C (True)	4.31*	525	0.60	2.0	2.09	40	525	524.5	2.97	3.42	Cryoscope

* Please note, participant performance for this analyte has been assessed using a z' score, rather than a z score, in order to account for the measurement uncertainty of the assigned value which is not negligible when compared to the SDPA.