

Desarrollo y evaluación de un material de referencia de leche en polvo entera

Development and evaluation of a whole milk powder reference material

Fernando Murcia-Rubiano¹
Olga Ávila-Guzmán²
Lynda Priero-Navarreta³
Pedro Rodríguez- Sandoval⁴

¹Biotrends Laboratorios (Colombia). Correo electrónico: fernando.murcia@biotrendslab.com
orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6852-3519>

²Biotrends Laboratorios (Colombia). Correo electrónico: olga.avila@biotrendslab.com
orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5252-9729>

³Biotrends Laboratorios (Colombia). Correo electrónico: lyndaprieto@gmail.com
orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0926-1605>

⁴Servicio Nacional de Aprendizaje SENA (Colombia). Correo electrónico: prodriguez@sena.edu.co
orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8124-9120>

Recibido: 13-07-2021 Aceptado: 14-12-2021

Cómo citar: Murcia-Rubiano, Fernando; Ávila-Guzmán, Olga; Priero-Navarreta, Lynda; Rodríguez-Sandoval, Pedro (2021). Desarrollo y evaluación de un material de referencia de leche en polvo entera. *Informador Técnico*, 86(1), 18 - 33.
<https://doi.org/10.23850/22565035.3775>

Resumen

Debido al importante papel que juegan los materiales de referencia (MR) en el sistema de aseguramiento de la calidad de los laboratorios de análisis de alimentos, esta investigación tuvo como objetivo desarrollar y evaluar un MR de leche en polvo entera para la medición de proteína total. Los estudios de homogeneidad, estabilidad y caracterización se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de la Guía ISO 35:2017 y la Norma NTC-ISO 13528:2017. El estudio de homogeneidad se realizó utilizando una muestra de 10 unidades bajo condiciones de reproducibilidad, el estudio de estabilidad a corto plazo se realizó a una temperatura de almacenamiento de 27 °C durante 2 meses siguiendo un diseño isócrono. La estrategia de caracterización consistió en la transferencia de valor de un MR muy similar utilizando un único método realizado por un laboratorio. El análisis estadístico aplicado permitió determinar la homogeneidad y la estabilidad del parámetro de proteína total durante el transporte. Finalmente, la asignación del valor de propiedad del material fue 25,99 g/100 g de proteína total con una incertidumbre estimada $U = \pm 0,90$ g/100 g.

Palabras clave: estudio de homogeneidad; estudio de estabilidad a corto plazo; estudio de caracterización; valor asignado; ISO 17034; incertidumbre expandida; proteína total; material de referencia; leche entera; metodología Kjeldahl.

Abstract

Due to the important role that reference materials (MR) play in the quality assurance system of food analysis laboratories, this research aimed to develop and evaluate a whole milk powder reference material for protein measurement. The homogeneity, stability, and characterization studies were carried out following the recommendations of the ISO 35:2017 Guide and the NTC-ISO 13528:2017 Standard. The homogeneity study was carried out using a sample of 10 units under reproducibility conditions, the short-term stability study was carried out at a storage temperature of 27 °C for 2 months following an isochronous design. The characterization strategy consisted of transferring the value of a very similar MR using a single method performed by a

laboratory. The applied statistical analysis allowed us to determine the homogeneity and stability of the total protein parameter during transport. Finally, the assignment of the property value of the material was 25.99 g/100g of total protein with an estimated uncertainty $U = \pm 0.90$ g/100 g.

Keywords: homogeneity study; short-term stability study; characterization study; assigned value; ISO 17034; expanded uncertainty; total protein; reference material; whole milk; Kjeldahl methodology.

1. Introducción

Durante los procesos de producción en la industria de alimentos se requiere información válida acerca de la calidad e inocuidad para la toma de decisiones sobre los productos que serán objeto de distribución y comercialización. Es por ello, que los laboratorios de ensayo, asociados a esta actividad, deben demostrar de forma objetiva y suficiente la validez de sus resultados.

Para lograr dicho objetivo, los laboratorios diseñan e implementan en el marco del aseguramiento de la calidad de sus ensayos diferentes herramientas, entre las cuales se encuentran, sin limitarse a ellas, la participación en ensayos de aptitud, el análisis de muestras enriquecidas y el uso de material de referencia. Este último, resulta particularmente efectivo para evaluar y demostrar la validez de los datos analíticos (Barwick; Burke; Lawn; Roper; Walker, 2001).

Un material de referencia es suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades específicas, el cual ha sido establecido como adecuado para el uso previsto en un proceso de medición (GTC-ISO 30:2014).

Padua-Gandra *et al.* (2016) resaltan la relevancia de los materiales de referencia en los procesos de validación de métodos, en el desarrollo del control de calidad interno y en la trazabilidad de las mediciones a los sistemas internacionales. No obstante, en el mercado no existen materiales de referencia para todos los análisis químicos que se realizan actualmente en los laboratorios de ensayos; los pocos materiales existentes son costosos debido, por una parte, a los costos asociados a los procesos de producción y, por otra y en gran medida, a los costos de importación necesarios para tener acceso a dicho material. Por lo anterior, se hace visible la limitada capacidad nacional para la producción de este tipo de materiales, lo que pone de manifiesto los inconvenientes para su adquisición, la nula disponibilidad en el mercado nacional y su alto costo (Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial [ONUDI], 2020).

De este modo, se hace necesario alcanzar capacidades en el país para el desarrollo y producción de un material de referencia que pueda emplearse para el sector de alimentos y así contribuir con el aseguramiento de la calidad analítica en los laboratorios y, por ende, a la competitividad en el mercado, al lograr resultados válidos que soporten los productos en mercados globales. La producción de un material de referencia para el análisis de proteína total en leche cobra importancia debido a que la leche tratada industrialmente, como mencionan Fernández *et al.* (2015), ha supuesto un gran avance en nutrición humana, ya que es un alimento completo y aporta proteína de alto valor biológico, hidratos de carbono, grasas, vitaminas y minerales. El consumo de este alimento provee una gran cantidad de proteínas fácilmente digeribles, además, con un elevado valor biológico por la gran cantidad de aminoácidos esenciales presentes en el producto. Su determinación se puede realizar a través del método de Kjeldahl (ISO 1871:2009), el cual consiste en una destrucción oxidativa de toda la materia orgánica encontrada en la muestra, con ayuda de un catalizador y el uso de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se realiza la destilación y, finalmente, una titulación para conocer el contenido total de compuestos nitrogenados en la muestra.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar y evaluar un material de referencia de leche en polvo entera para la medición de proteína total en el marco de participación en la convocatoria del

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, “Línea de fomento a la innovación y desarrollo tecnológico en las empresas 2019”, cumpliendo los lineamientos establecidos en el estándar internacional para los productores de materiales de referencia (ISO 17034:2017).

2. Materiales y métodos

2.1. Selección de la materia prima y el analito de interés

Se utilizó leche en polvo entera como insumo para la elaboración del material de referencia. Para su selección se realizó un análisis de la composición del contenido declarado en la etiqueta nutricional de diferentes leches de diversos productores y se seleccionó la de menor contenido neto de proteína, debido a que era el valor que mejor se adecuaba a los intervalos acreditados por los laboratorios de ensayo en cuanto a la cuantificación de proteína en matriz láctea. Se adquirieron 4 kg de la referencia de leche en polvo seleccionada procedente del mismo lote de producción y se almacenaron en su empaque original a temperatura ambiente entre 18 y 20 °C hasta la preparación del material.

2.2. Método analítico

Para la determinación de proteína total en leche se utilizó el método establecido en el documento normativo ISO 1871:2009, el cual forma parte del alcance acreditado de Biotrends Laboratorios SAS, bajo la ISO/IEC 17025:2017.

2.3. Verificación de la identidad de la materia prima

Se realizó la verificación de la identidad de la materia prima (entendida como el estudio de las características propias del producto) a través de un análisis cualitativo (color, olor y sabor) y cuantitativo (humedad, proteína total, grasa, acidez y cenizas), evaluando el cumplimiento de la leche en polvo con relación a las características fisicoquímicas y organolépticas establecidas en el Decreto 616 de 2016 y la NTC 1036:2015.

2.4. Preparación del material de referencia

Posterior a la verificación de identidad de la materia prima (leche en polvo) se realizó la homogenización de esta de forma manual, enseguida se realizó el tamizado empleando los tamices n.º 80, 120 y 170. Al producto obtenido se le realizó una nueva homogeneización manual para continuar con el envasado. Con ayuda de una balanza analítica de precisión se pesaron y empacaron 25 g del prototipo del material en frascos de PVC color ámbar con tapa tipo *push down*. Cada envase tenía un sello sensitivo de espuma de poliestireno, con el fin de evitar cualquier pérdida o contaminación del material. Cada unidad del prototipo en su empaque primario se identificó mediante una etiqueta diseñada que seguía los requisitos establecidos en la Guía ISO 31:2015, posteriormente el frasco se empacó en una bolsa de PET/PEBD con sello *zipper* y se realizó el embalaje final en una caja de cartón de micro Kraft blanco.

2.5. Estudio de homogeneidad

Siguiendo las recomendaciones de la Guía ISO 35:2017 se realizó el estudio de homogeneidad, el cual consistió en realizar el análisis de proteína total por duplicado sobre 10 unidades del prototipo del material elaborado. Los resultados analíticos obtenidos se evaluaron mediante el test de Grubbs para la determinación de datos atípicos. Posteriormente, se realizó el análisis de tendencias de los resultados teniendo como criterios el orden de envasado y el orden en la ejecución de los análisis ejecutados, la prueba de normalidad de los datos y un análisis de varianza (ANOVA), aplicando una prueba F de Fisher, utilizando un nivel de significancia de 0,05.

2.6. Estudio de estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad a corto plazo, en el que se seleccionaron 10 unidades del prototipo de material referencia por medio de un muestreo simple aleatorio. Las muestras fueron sometidas a un almacenamiento a una temperatura elevada (27 °C), superior a la temperatura ambiente de la zona (Bogotá, Colombia), durante un periodo de 60 días, donde se realizaron seguimientos a los 0, 20, 40, 50 y 60 días. El estudio se ejecutó siguiendo un modelo isócrono. El análisis estadístico de los resultados consistió en la inspección de datos atípicos empleando el test de Grubbs. Posteriormente, se aplicó una prueba de regresión lineal utilizando como evaluación la significancia de la pendiente mediante la prueba t , como recomienda la Guía ISO 35:2017 y, finalmente, se realizó un análisis de varianza para comprobar la estabilidad a corto plazo del material, aplicando una prueba F de Fisher, utilizando un nivel de significancia de 0,05 para determinar diferencias estadísticamente significativas.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los estudios de homogeneidad, estabilidad y asignación de valor se realizó siguiendo los lineamientos proporcionados en la Guía ISO 35:2017 y las Normas NTC-ISO 13528:2017, NTC-ISO 17034:2017. En la Tabla 1 se presenta la lista de las ecuaciones y términos matemáticos utilizados para la evaluación de los estudios de homogeneidad, estabilidad, caracterización y estimación de la incertidumbre combinada y expandida.

Tabla 1. Ecuaciones utilizadas en los estudios analíticos para la elaboración del material de referencia.

Ecuación	Descripción	Número
b_1	b_1 Es el valor de la pendiente de regresión lineal de los datos, la cual se estimó a través de método gráfico.	(1)
$t_{0,95,n-2}$	Hace referencia al factor t de la tabla Student con un nivel de confianza del 95 % y grados de libertad $n-2$.	(2)
$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2}}$	s corresponde al valor de la raíz cuadrada de la desviación estándar de los datos, Y_i , X_i corresponden a los valores experimentales obtenidos y los factores b_0 , b_1 se calcularon a partir de la regresión lineal de los datos.	(3)
$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$	$s(b_1)$ es el valor de la incertidumbre asociada a la pendiente.	(4)
$u_{hom} = \sqrt{MS_{ENTRE} - MS_{DENTRO}/n}$	u_{hom} es el valor de incertidumbre atribuido por el estudio de homogeneidad; MS_{DENTRO} es el valor del cuadrado medio dentro de los grupos, MS_{ENTRE} es el valor del cuadrado medio entre grupos, no es la cantidad de réplicas.	(5)
$u_{estb} = s(b_1) \times t$	u_{estb} es el valor de la incertidumbre de medición atribuida por el estudio de estabilidad; t es el tiempo de duración del estudio de estabilidad.	(6)
$u_{cart} = \sqrt{u_{MR}^2 + u_d^2}$	u_{cart} es el valor de la incertidumbre de medición atribuida por el estudio de caracterización; u_{MR} es el valor de incertidumbre del material de referencia de MUVA; u_d es el valor de incertidumbre de las diferencias experimentales del material de referencia de MUVA.	(7)

Ecuación	Descripción	Número
$u_d = s_d / \sqrt{n}$	u_d corresponde a la incertidumbre de las diferencias experimentales del material de referencia de MUVA; s_d corresponde al valor de la desviación estándar de las diferencias.	(8)
$u_{va} = \sqrt{u_{hom}^2 + u_{estb}^2 + u_{cart}^2}$	u_{va} corresponde al valor de la incertidumbre estimada del material de referencia.	(9)
$U = K * u_{va}$	U hace referencia a la incertidumbre expandida del material de referencia; corresponde al valor del factor de cobertura, en este caso $K = 2$, equivalente a 95 % de probabilidad.	(10)

Fuente: elaboración propia.

2.8. Asignación del valor al material

La estrategia de asignación del valor al material usado fue la transferencia de valor de un material de referencia a un candidato muy similar, utilizando un único método realizado por un laboratorio (NTC-ISO 17034:2017). Para este estudio se utilizó el MR del proveedor MUVA Kempton GmbH de Alemania, "Spray Dried Whole Milk Powder".

3. Resultados

3.1. Selección de la materia prima y verificación de la identidad

Los resultados de las pruebas de verificación de identidad realizadas a la leche en polvo entera permitieron determinar el cumplimiento de los requisitos establecidos como las características fisicoquímicas y organolépticas según el Decreto 616 de 2016 y a la NTC 1036:2015. Es decir, que la materia prima presentó características de color, olor y sabor característicos, así como parámetros cuantitativos que se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de verificación de identidad de materia prima.

Parámetro	Resultado (g/100 g)	Especificación (g/100 g)
Humedad	2,13	Máx. 4,0
Proteína total	25,5	Mín. 24,5
Grasa	28,0	26,0-33,0
Acidez	1,10	0,9-1,3
Cenizas	6,0	Máx. 6,0

Fuente: elaboración propia.

Se determinó en escala de producción de planta piloto que, a partir de 3 kg de materia prima, se producen 73 unidades de material de 25 g del prototipo del MR. La etapa de tamizado permitió caracterizar la materia prima a trabajar con un tamaño de partícula menor a 180 μm .

3.2. Estudio de homogeneidad

3.2.1. Identificación de valores atípicos

Los resultados del estudio de homogeneidad se presentan en la Tabla 3. Estos fueron sometidos al test de Grubbs, con el objetivo de detectar valores atípicos en el conjunto de datos. Para la prueba se definió un nivel de significancia (α) de 0,05, planteando como hipótesis nula H_0 = no existen valores atípicos en el conjunto de datos. La prueba dio como resultado $p > 0,05$, que al compararlo con el nivel de significancia escogido para el análisis corroboró la hipótesis nula, estableciendo que no existieron valores atípicos en el conjunto de datos, lo que permitió utilizar el conjunto de datos inicial para el posterior tratamiento estadístico.

Tabla 3. Resultados del análisis de proteína total del estudio de homogeneidad.

N.º de envase	N.º de unidad	Proteína total Réplica 1 (g/100 g)	Proteína total Réplica 2 (g/100 g)	Proteína total Promedio (g/100 g)
1	007	25,45	25,54	25,50
2	016	25,49	25,35	25,42
3	024	25,55	25,47	25,51
4	027	25,39	25,43	25,41
5	030	25,21	25,38	25,30
6	042	25,47	25,48	25,48
7	053	25,35	25,25	25,30
8	060	25,25	25,27	25,26
9	063	25,45	25,16	25,31
10	073	25,20	25,40	25,30

Fuente: elaboración propia.

3.2.2. Análisis de tendencias

En la Tabla 4 se presentan los resultados del análisis de tendencias. Para este se asumió que los datos se ajustaban a un modelo de regresión lineal. A partir de esto se realizó el análisis de la significancia de la pendiente de los datos con un factor t student para una probabilidad del 95 %, y el valor de la incertidumbre asociada a la pendiente.

Tabla 4. Resultados del análisis de tendencias de los datos.

Tendencia analizada	Pendiente de regresión lineal (b_1)	Factor de la tabla t student ($t_{0,95,n-2}$)	Valor de la incertidumbre asociada $s(b_1)$	Evaluación de la significancia ($t_{0,95,n-2}) * s(b_1)$	Conclusión
Según el orden de envasado	0,0377	2,30	0,018	0,041	No se observaron tendencias significativas
Según el orden de análisis	0,0038	2,30	0,02	0,051	No se observaron tendencias significativas

Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la Tabla 4 y en las gráficas siguientes, el valor de la evaluación de la significancia de la pendiente fue mayor al valor de la pendiente de los datos, lo que permitió establecer que no se presentaron tendencias significativas en los datos según el orden de envasado ni el orden de la realización de los 20 ensayos realizados. Teniendo en cuenta los resultados del análisis de tendencias, se estableció que no se presentaron desviaciones en la etapa de envasado del lote de producción ni en la etapa de análisis del material (Figura 1 y 2).

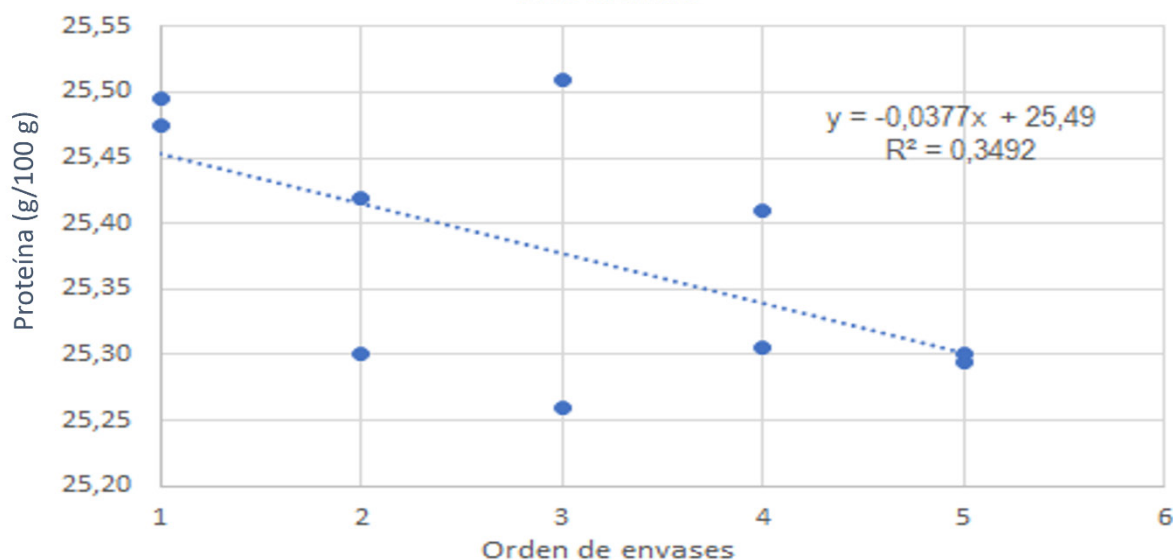


Figura 1. Análisis de tendencias según el orden de envasado.

Fuente: elaboración propia.

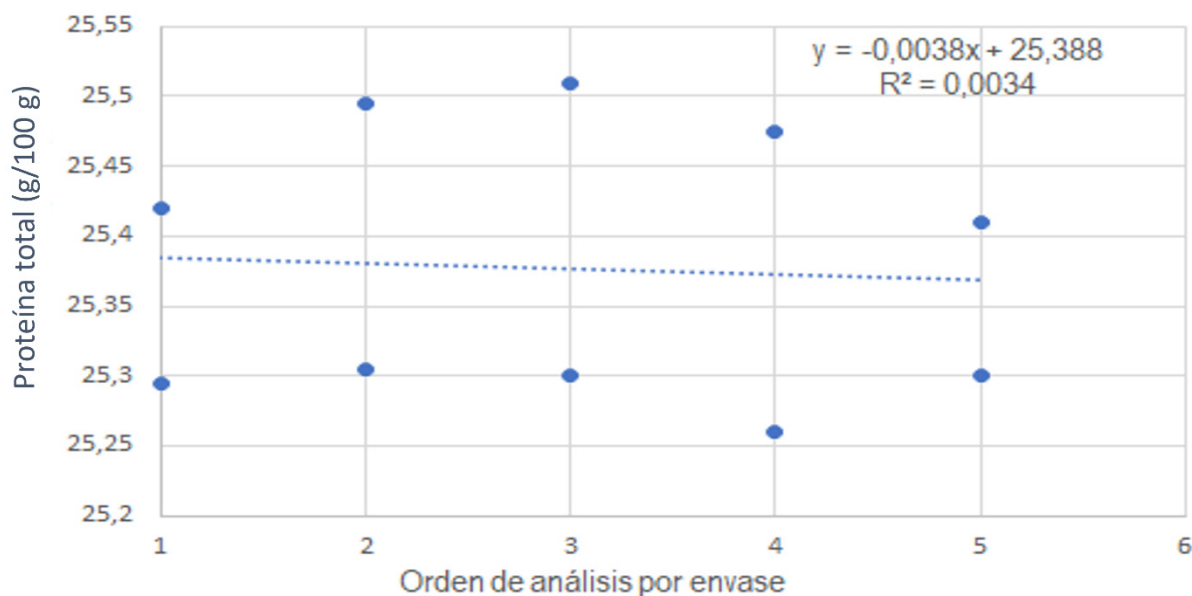


Figura 2. Análisis de tendencias según el orden de medición.
Fuente: elaboración propia.

3.2.3. Prueba de normalidad

Se realizó una prueba de normalidad al conjunto de los datos con el objetivo de definir los análisis estadísticos a utilizar posteriormente. Se utilizó la prueba de Ryan Joiner, debido a como indican Salafranca, Sierra, Núñez, Solanas y Leiva (2005) esta resulta extremadamente útil para muestras de pequeño tamaño ($n < 30$). El valor p de la prueba fue mayor al nivel de significancia escogido $\alpha = 0,05$, por lo que se acepta la hipótesis nula de que los datos presentan una distribución normal. Una vez se estableció la normalidad de los datos se procedió a aplicar un análisis de varianza (ANOVA), para comprobar la homogeneidad del material en el valor de proteína.

3.2.4. Análisis de varianza

La homogeneidad de los datos se comprobó a través de un análisis de varianza (ANOVA). Empleando el estadístico F de Fisher se planteó la hipótesis nula H_0 = las medias de los valores de proteína total de los 10 envases analizados son iguales, el nivel de significancia escogido fue $\alpha = 0,05$. En la Tabla 5 se presentan los resultados del análisis, el valor de probabilidad correspondió a $p = 0,165$ lo que permitió aceptar la hipótesis nula, la cual estableció que ninguno de los datos es estadísticamente diferente a los demás, determinando que la media de cada envase analizado es estadísticamente igual entre ellos. Esto permitió establecer la homogeneidad del parámetro de proteína total en el material. Se estimó la contribución a la incertidumbre combinada aportada por el estudio de homogeneidad aplicando la ecuación (5) de la Tabla 1, el resultado se presenta en la Tabla 7.

Tabla 5. Resultados análisis de varianza del estudio de homogeneidad.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma ajustada de los cuadrados (SS)	Cuadrados medios (MS)	Valor F	Valor P
Entre grupos	9	0,16857	0,01873	1,91	0,165
Dentro de los grupos	10	0,09830	0,00983		
Total	19	0,26687			

Fuente: elaboración propia.

3.3. Estudio de estabilidad

3.3.1. Identificación de valores atípicos

Se utilizó el test de Grubbs para identificar valores anómalos en el conjunto de datos, el test dio como resultado un valor de probabilidad de p mayor a 0,05, que al compararlo con el nivel de significancia escogido para el estudio ($\alpha = 0,05$) da por encima, lo que corrobora la hipótesis nula (H_0 = no hay valores atípicos en el conjunto de datos) del estadístico escogido. Con esta conclusión se realizó el análisis estadístico sin la exclusión de ningún resultado experimental obtenido.

3.3.2. Análisis de regresión lineal

La evaluación de la estabilidad del material de referencia se hizo siguiendo la recomendación proporcionada en la Guía ISO 35:2017. Se realizó la regresión lineal del contenido de proteína total en función del tiempo y se examinó la pendiente en términos de significancia a través de la comprobación con una prueba t student. En la Tabla 6 se presentan los resultados del estudio. La evaluación de la significancia de los datos permitió establecer que el valor de la pendiente de la recta es menor al producto entre la incertidumbre asociada y el factor t para una probabilidad del 95 %, lo que indica que el material es estable en el valor de proteína total durante el tiempo y condiciones evaluadas. La contribución a la incertidumbre combinada aportada por el estudio de estabilidad se estimó aplicando las ecuaciones (3) (4) y (6) de la Tabla 1, los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 6. Resultados de la evaluación de la estabilidad del material de referencia.

Valor de la pendiente de regresión lineal (b_1)	Valor de la tabla t student ($t_{0,95,n-2}$)	Valor de la incertidumbre asociada $s(b_1)$	Valor para evaluación de la significancia ($t_{0,95,n-2} * s(b_1)$)	Evaluación de la significancia
0,0044	3,182	0,0027	0,0086	$ b_1 < t_{0,95,n-2} * s(b_1)$

Fuente: elaboración propia.

Además de la evaluación de la estabilidad del material a través del análisis de tendencias se empleó el análisis de varianza aplicando una prueba F con un 95 % de probabilidad donde se en buscan las diferencias estadísticamente significativas.

3.3.3. Análisis de varianza (ANOVA)

Se realizó una prueba de normalidad a los datos, con el objetivo de determinar si estos se acoplaban a esta distribución, para posteriormente aplicar el análisis de varianza. La prueba de normalidad de Ryan Joiner aplicada dio como resultado un $p > 0,1$, siendo este mayor al nivel de significancia escogido $\alpha = 0,05$, de esta manera se aceptó la hipótesis nula de que el conjunto de datos presenta una distribución de tipo normal. Posteriormente, se aplicó la prueba paramétrica empleando estadístico F de Fisher, que dio como resultado un valor de probabilidad de $p = 0,258$, mayor al nivel de significancia escogido ($\alpha = 0,05$), lo que permitió aceptar la hipótesis nula que estableció que ninguno de los datos es estadísticamente diferente a los demás, de lo que se concluye que el valor de proteína no cambió a través del tiempo, corroborando la estabilidad del material a corto plazo.

3.4. Asignación de valor al material

En la Tabla 7 se presentan los resultados de la evaluación experimental del material de referencia desarrollado por Biotrends Laboratorios y del material de referencia del productor MUVA. Se indican los resultados del promedio de ambas mediciones luego de comprobar que los dos conjuntos de información no presentan datos anómalos por medio de la aplicación del test de Grubbs, teniendo como resultado $p > 0,05$, que al ser mayor al nivel de significancia escogido ($\alpha = 0,05$), determina la no existencia de valores atípicos. Posteriormente, se evaluó la normalidad de los datos a través de la aplicación de la prueba de normalidad de Ryan Joiner (Salafranca *et al.*, 2005) y se realizó un análisis de varianza, comprobando así la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en los datos obtenidos experimentalmente.

Tabla 7. Resultados del estudio de caracterización.

	MR MUVA Reportado en el certificado $x_{C_{MUVA}}$	MR MUVA Resultado experimental $x_{E_{MUVA}}$	MR Biotrends Resultado experimental $x_{E_{BIOTRENDS}}$	MR Biotrends resultado de la transferencia de valor $x_{A_{BIOTRENDS}}$
Valor de proteína Total (g/100g)	26,77 ± 0,41*	26,30 ± 0,07*	25,52	25,99

* Incertidumbre expandida.

Fuente: elaboración propia.

Para establecer el valor asignado del material de referencia producido por Biotrends Laboratorios se realizó la transferencia de la diferencia encontrada entre el valor de proteína total del material producido por MUVA, reportado en el certificado ($x_{C_{MUVA}}$) y el valor experimental obtenido en el laboratorio $x_{E_{MUVA}}$ que fue de 0,47 g/100g. Teniendo en cuenta el valor experimental obtenido del material de referencia producido por Biotrends Laboratorios, el cual fue de 25,52 g/100 g y la diferencia hallada (0,47 g/100g), la transferencia da como resultado un valor de 25,99 g/100 g de proteína total, el cual se establece como valor de referencia. La contribución a la incertidumbre combinada aportada por el estudio de caracterización se estimó aplicando las ecuaciones (7) y (8) de la Tabla 1 y los resultados se presentan en la Tabla 8.

3.5. Estimación de la incertidumbre del material de referencia

La estimación de la incertidumbre del material de referencia se realizó siguiendo los lineamientos de la Guía ISO 35:2017 y la Norma NTC-ISO 13528:2017. La metodología para la estimación de la incertidumbre de los estudios de homogeneidad y estabilidad concordaron con lo propuesto por Yang, Jiao, Zhang, Du y Lu (2017), quienes desarrollaron un nuevo material de referencia certificado (MRC) de ácido clorogénico (CHA) y estimaron la incertidumbre de los estudios de homogeneidad y estabilidad de acuerdo con las ecuaciones (5) y (6) de la Tabla 1, utilizando un factor de cobertura ($k = 2$) con un nivel de significancia del 95 % para la estimación de la incertidumbre expandida. En la Tabla 8 se presentan los resultados de la estimación de la incertidumbre del material, donde se identificaron como fuentes el estudio de homogeneidad, estabilidad a corto plazo y la asignación de valor. Así mismo, se observa el aporte de dichas contribuciones en la Figura 3.

Tabla 8. Estimación de la incertidumbre del material de referencia.

	Parámetro	Resultado
Estudio de homogeneidad	MS_{ENTRE}	0,01873
	MS_{DENTRO}	0,00983
	Ecuación	(5)
	u_{hom}	$\pm 0,063$
Estudio de estabilidad	$s(b_1)$	$\pm 0,0027$
	Ecuación	(6)
	u_{estb}	$\pm 0,162$
Asignación de valor	s_d	0,17
	u_d	$\pm 0,10$
	u_{MR}	$\pm 0,41$
	Ecuación	(8) y (9)
	u_{cart}	$\pm 0,42$
Incertidumbre combinada	Ecuación	(10)
	u_{va}	$\pm 0,45$
Incertidumbre expandida	Ecuación	(11)
	u	$\pm 0,90$

Fuente: elaboración propia.

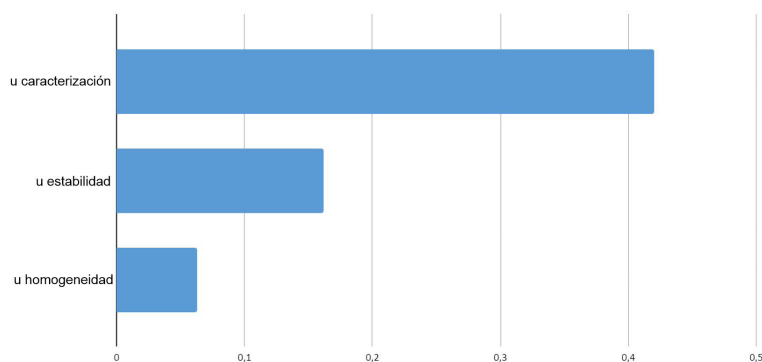


Figura 3. Pareto contribución fuentes de incertidumbre.
Fuente: elaboración propia.

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 8, la estimación de la incertidumbre expandida del material de referencia de leche en polvo entera fue de $\pm 0,90$ g/100 g. Finalmente, el valor de referencia de proteína total del material, el cual fue asignado por medio del estudio de caracterización fue de 25,99 g/100 g $\pm 0,90$ g/100 g.

4. Discusión

La leche en polvo entera constituye un importante blanco para la industria de alimentos, pues hace parte de la dieta humana en todos los grupos de edad, por lo que es considerada como un producto de primera necesidad. En Colombia, según la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN, 2021), en el año 2020 la producción de leche fue de 7393 millones de litros. El sector lácteo tiene una participación de 36,7 % en el PIB pecuario nacional y se anunció entrega de apoyos del gobierno nacional para su crecimiento, entre los que encuentra la inversión de \$ 4.000 millones de pesos, con el fin de incentivar la exportación y la compra de excedentes de producción.

Así mismo, se establecieron planes orientados a la promoción del consumo de lácteos y a la creación de líneas de crédito para la financiación de plantas de pulverización, incentivando la producción de leche en polvo en el país (Ministerio de agricultura, 2020). Con el crecimiento del sector se prevé la necesidad de fortalecer las estrategias de control de calidad, que incluyen el análisis de calidad del producto a través de la ejecución de ensayos que permitan medir los parámetros que exige la legislación nacional, particularmente, proteína y grasa, al ser dos componentes de importante valor nutricional.

Los ensayos de laboratorio que permitan realizar esta evaluación deberán realizarse en el marco de los más altos estándares de calidad, con el fin de avanzar en la metrología química y en el aseguramiento de la calidad analítica en el sector lácteo (Pires *et al.*, 2017). En esta labor, los materiales de referencia cumplen un importante papel para asegurar la validez de los resultados en los laboratorios de ensayo. Lo anterior sustenta los objetivos del presente artículo, cuya finalidad última es contribuir con el fortalecimiento de la industria láctea.

En el marco del proyecto se desarrolló un material con leche en polvo, candidato a ser MR dadas las características de la matriz tales como su vida útil prolongada, la facilidad en su manipulación y conservación, así como la posibilidad de garantizar sus condiciones de estabilidad y homogeneidad. Es así como se realizó la producción de 73 unidades de 25 g del MR de leche en polvo entera para el parámetro de proteína total.

Para el estudio de homogeneidad realizado se tuvieron en cuenta los requisitos establecidos en la Guía ISO 35:2017, tal y como lo sugieren Bastos et al (2020), quienes elaboraron un material de referencia para la cuantificación de vanadio, níquel, sodio, calcio, estroncio y bario en petróleo crudo. La evaluación realizada indicó que no se evidencian tendencias significativas en el orden de medición de las muestras, ni el de procesamiento. El modelo estadístico propuesto fue aplicado de forma homóloga en el material producido por Biotrends, en donde el análisis de regresión permitió descartar posibles tendencias significativas en los datos. Tanto en el estudio propuesto por Bastos *et al.* (2020) como en el realizado por el laboratorio se demostró la homogeneidad del material, dentro y entre los envases, utilizando el análisis de varianza ANOVA a través de la prueba F con una probabilidad de $p > 0,05$, característica imprescindible de un material de referencia, que permite a los usuarios del mismo garantizar reproducibilidad del valor asignado, lo que aporta trazabilidad y confianza a sus mediciones.

El estudio de estabilidad a corto plazo se realizó con el objetivo de establecer la integridad del material en condiciones de transporte. Como lo establece la Guía ISO 35:2017, es importante conocer el comportamiento del material en condiciones extremas de manipulación, por ello el estudio se realizó bajo condiciones de almacenamiento a 27 °C, temperatura que se podría presentar en las ciudades más calurosas del país (Colombia), aun realizando el envío en condiciones de refrigeración por un periodo de 2 meses.

El análisis de resultados del estudio mostró que el valor de proteína del material se mantiene estable a dicha temperatura, dado a que la regresión lineal de los datos no reveló tendencias significativas. Enfoques similares fueron establecidos en estudios de estabilidad a corto plazo en distintos materiales de referencia. Chew *et al.* (2016) desarrollaron un MR de polvo de hongos para mediciones de calcio, arsénico, cadmio y plomo, donde escogieron una temperatura de transporte máxima permitida de 40 °C durante un periodo de 2 meses y al igual que en el presente estudio se observó que los analitos eran estables bajo las condiciones de transporte establecidas. Otras condiciones se presentan en el estudio realizado por Bolzoni, Marcolini, Ferrini y Buffoli (2016), quienes para evaluar posibles alteraciones por temperatura simulaban un transporte en periodos cálidos a una temperatura de 44 °C durante una semana, en un material de referencia de leche liofilizada para determinación de fosfatasa alcalina, confirmando la estabilidad a corto plazo del material en dichas condiciones de transporte.

Una vez comprobada la estabilidad del material bajo condiciones de transporte, es necesario realizar un segundo estudio de estabilidad, de acuerdo con lo establecido en la Guía ISO 35:2017, este deberá realizarse a largo plazo, con el fin de evaluar el comportamiento del valor de proteína del material en el lugar de almacenamiento. Dicho estudio se realizaría en un periodo de 12 meses o más, garantizando que el valor asignado se mantendrá estable durante el tiempo establecido bajo las condiciones de almacenamiento especificadas.

Finalmente, la asignación de valor del material de referencia se realizó siguiendo una de las estrategias planteadas por la Norma NTC-ISO 17034:2017, la cual consistió en la transferencia de valor de un MR a un candidato a MR muy similar, llevada a cabo utilizando un único método realizado por un laboratorio. Bajo este enfoque se estableció un valor asignado de proteína de 25,99 g/100 g. Esta estrategia, como se muestra en los resultados de la estimación de la incertidumbre del material, conllevó a que la asignación de valor fuera la fuente de mayor aportación en la estimación de la incertidumbre combinada del material, proporcionando un valor de $u_{cart} \pm 0,42$, esto posiblemente debido a que en esta estrategia se incluye la incertidumbre declarada del material de referencia de MUVA. El aporte de incertidumbre de los demás estudios contribuyó en el siguiente orden estudio de estabilidad y estudio de homogeneidad, con una incertidumbre expandida de 0,90. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que se debe incluir el aporte a la estimación de la incertidumbre del estudio de estabilidad a largo plazo.

5. Conclusiones

Se diseñó y elaboró un nuevo material de referencia de leche en polvo entera (MRLP01), lote 001FP para el mensurando de proteína total. Los resultados de los estudios permitieron establecer que la leche en polvo entera es una matriz adecuada como insumo en la elaboración del material de referencia para el análisis de proteína total. Con base en los hallazgos obtenidos, se encontró que el material de referencia elaborado cumple con los requisitos de homogeneidad y estabilidad a corto plazo.

El método empleado para la determinación de proteína basado en la metodología Kjeldahl, que sigue el procedimiento establecido en el documento normativo ISO 1871:2009 permitió la obtención de valores veraces para el desarrollo del material de referencia de leche en polvo propuesto por Biotrends Laboratorios.

El material de referencia de leche en polvo entera producido fue homogéneo en el valor de proteína total de acuerdo con los requisitos de la Guía ISO 35:2017, donde el valor asignado de proteína fue $25,99 \pm 0,90$ g/100 g, valores que se establecieron siguiendo los lineamientos de la norma NTC-ISO 13528:2017. Los estudios realizados al material permitieron establecer la idoneidad del proceso de producción, envasado y almacenamiento para el cumplimiento de las características de homogeneidad y estabilidad a corto plazo.

6. Recomendaciones

En caso de requerir escalar el proceso de producción a nivel industrial, sería necesario un estudio de factibilidad comercial que justifique una producción a grandes volúmenes. Escalar la producción requerirá, entonces, un modelamiento del proceso que incluye el redimensionamiento de los equipos y utensilios utilizados que permitan el manejo de volúmenes de producción más altos, así como un aumento de la capacidad de producción por el crecimiento de los recursos de operación, lo anterior en procura de garantizar la calidad del producto con base en los resultados obtenidos en el proceso, que ya se ha adaptado a pequeña escala. El desarrollo y producción del material de referencia de leche en polvo entera es una respuesta a la necesidad constante de producir nuevos MR en el país y esta investigación constituye una referencia para futuros productores de estos materiales.

Referencias

- Barwick, Vicki; Burke, Shaun; Lawn, Richard; Roper, Peter; Walker, Ron (2001). *Applications of reference materials in analytical chemistry*. Cambridge: Laboratory of the Government Chemist.
- Bastos, Thábita; Valli, Luiza; de Sena, Rodrigo; Ribeiro, Eustáquio; Pedrini, Geisamanda; Weitzel, Maria-Tereza (2020). Preparation of a reference for crude oil trace elements: Study of homogeneity and stability. *Microchemical Journal*, 155, 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104799>
- Bolzoni, Giuseppe; Marcolini, A.; Ferrini, A.; Buffoli, E. (2016). Production and validation of an alkaline Phosphatase Reference Material in Lyophilized Milk. *Food Analytical Methods*, 10, 559-564.
<https://doi.org/10.1007/s12161-016-0615-2>
- Chew, Gina; Peng, Lay; Yee, Sin; Ding, Yi; Shin, Richard; Kooi, Tong (2016). Development of a mushroom powder Certified Reference Material for calcium, arsenic, cadmium and lead measurements. *Food Chemistry*, 190, 293-299.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.071>

Federación Colombiana de Ganaderos (2021). *Estadísticas. Producción de leche en Colombia*.

<https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>

Fernández, Elena; Martínez, José; Martínez, Venacio; Moreno, José; Collado, Luis; Hernández, Marta; Morán, Francisco (2015). Revisión. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 92-101.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2014). GTC-ISO 30:2014. *Términos y definiciones usados en relación con los materiales de referencia*.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2015). Guía ISO 31:2015. *Reference materials- Contents of certificates, labels and accompanying documentation*.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2015). NTC 1036:2015. *Productos lácteos. Leche en polvo*.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2017). Guía ISO 35:2017. *Reference materials-Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2017). NTC-ISO 17034:2017. *Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia*.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2017). NTC-ISO 13528:2017. *Métodos estadísticos para uso en ensayos de aptitud por comparación Inter laboratorio*.

Ministerio de Agricultura (2020). *Sector lácteo recibirá \$4.000 millones para incentivo a la exportación y compra de excedentes de producción*.

[https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Sector-l%C3%A1cteo-recibir%C3%A1-\\$4-000-millones-para-incentivo-a-la-exportaci%C3%B3n-y-compra-de-excedentes-de-producci%C3%B3n.aspx](https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Sector-l%C3%A1cteo-recibir%C3%A1-$4-000-millones-para-incentivo-a-la-exportaci%C3%B3n-y-compra-de-excedentes-de-producci%C3%B3n.aspx)

Ministerio de la Protección Social. (2006, 28 de febrero). Decreto 616 de 2016. *Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país*.

Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (2020). Diagnóstico de servicios de la infraestructura de calidad colombiana. Sector químico con enfoque en laboratorios de ensayo. *Servicios de la infraestructura de calidad. Materiales de referencia certificados (MRC)* (pp. 80-81). Organización de las Naciones Unidas.

Organización Internacional de Normalización (2009). ISO 1871:2009. *Food and feed products – General guidelines for the determination of nitrogen by the kjeldahl method* (2a ed.).

Organización Internacional de Normalización (2017). ISO/IEC 17025:2017. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.

Padua-Gandra, Renata; Soares dos Santos, Ana; Borges dos Santos, Pedro; Leite-Alvarenga, Ronália; Gonçalves-Junqueira, Roberto; Labanca, Renata; Carvalho de Souza, Scherilla (2016). Production and evaluation of a reference material for moisture, ash, and total fat mass fractions, and titratable acidity in whole milk powder. *Accreditation and Quality Assurance*, 21, 47-55.

<https://doi.org/10.1007/s00769-015-1179-3>

Pires, Eliane; Freitas, Evelyn; Marques, Janaína; Scarlato, Renata; Nogueira, Regina; Duarte, Annibal (2017). Feasibility study for development of candidate reference material for food analysis: Chloramphenicol in milk powder. *Measurement*, 98, 300-304.

<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2016.05.009>

- Salafranca, L.; Sierra, V.; Núñez, M. I.; Solanas, A.; Leiva, D. (2005). Análisis estadístico mediante aplicaciones informáticas SPSS. *Statgraphics, minitab y excel* (p. 213). Barcelona: Adolf Florensa.
- Yang, Dezhi; Jiao, LingTai; Zhang, Baoxi; Du, Guanhua; Lu, Yang (2017). Development of a new chlorogenic acid certified reference material for food and drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 140, 169-173.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.026>