



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## **Grao en Bioloxía**

### **Memoria do Traballo de Fin de Grao**

**Análise comparativo do contido en proteínas entre varias marcas de leite no mercado e as posibles diferencias nas distintas variantes: leite enteiro, semidesnatado e desnatado**

**Análisis comparativo del contenido en proteínas entre varias marcas de leche en el mercado y las posibles diferencias entre las distintas variantes: leche entera, semidesnatada y desnatada**

**Comparative analysis of the protein content among several brands of milk, and the possible differences referring to the type variants: whole, semi-skimmed and skimmed milk**

**Loreto Cabarcos Mouzo**

Xuño, 2019

*Directoras Académicas: María Graciela Estévez Pérez y  
María Esther Rodríguez Belmonte*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dna. María Esther Rodríguez Belmonte, profesora titular do Departamento de Bioloxía da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña, e Dna. María Graciela Estévez Pérez, do Departamento de Estatística e Investigación Operativa da Universidade da Coruña, autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao ***“Análise comparativa do contido en proteínas entre varias marcas de leite no mercado e as posibles diferencias nas distintas variantes: leite enteiro, semidesnatado e desnatado.”*** presentado pola alumna Loreto Cabarcos Mouzo, para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 20 de Xuño do 2019

Asinado: M. Esther Rodríguez Belmonte

Asinado: Graciela Estévez Pérez

# ÍNDICE

## Resumen y palabras clave

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>5</b>
3.1. Recogida de muestras.....	5
3.2. Procesamiento de las muestras.....	5
3.3. Determinación de proteína total y caseína.....	7
3.4. Determinación del tamaño muestral.....	7
3.5. Análisis estadístico de los datos.....	9
<b>4. Resultados.....</b>	<b>10</b>
4.1. Resultados de la determinación de proteína total.....	10
4.2. Resultados del porcentaje de caseína.....	17
<b>5. Discusión.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>20</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>22</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 .....	1
Figura 2 .....	2
Figura 3 .....	8
Figura 4 .....	11
Figura 5 .....	11
Figura 6 .....	13
Figura 7 .....	15
Tabla 1 .....	10
Tabla 2 .....	12
Tabla 3 .....	14
Tabla 4 .....	14
Tabla 5 .....	17
Tabla 6 .....	18

## RESUMEN

La leche bovina es uno de los alimentos básicos que más beneficios aporta al organismo. Contiene aproximadamente una media de 32g/L de proteína que parece variar según la marca o tipo de leche (entera, semidesnatada y desnatada) lo cual se puede observar en los etiquetados obligatorios de información nutricional presentes en los envases. Estas variaciones parecen atender a diversos factores tanto ambientales como propios del animal (alimentación, salud, edad, etc.).

Un análisis del nivel de proteína en cada una de las marcas y tipos de leche sería un buen indicador de la fiabilidad de estos etiquetados, y además, permitiría observar si existen diferencias significativas en la cantidad de proteína de acuerdo a cada una de las variables (Marca y Tipo).

En esta investigación se ha realizado un análisis del nivel de proteína presente en cuatro marcas distintas (M1, M2, M3 y M4) y en sus tres tipos de leche (entera, semidesnatada y desnatada). Como resultado se ha obtenido que no existen diferencias significativas en el nivel de proteína (g/100mL) entre las cuatro marcas de leche analizadas y sus tres tipos. Sin embargo, al analizar cada marca individualmente, se han detectado pequeñas diferencias en la cantidad de proteína de la leche semidesnatada respecto a la cantidad de proteína de la leche entera y desnatada de la marca M2. De la misma forma, se detectaron diferencias en el nivel de proteína de la leche desnatada, semidesnatada y entera de la marca M3.

**PALABRAS CLAVE:** Proteína - Caseína - Leche - Vaca - Entera - Semidesnatada - Desnatada - Marcas

## RESUMO

O leite bovino é un dos alimentos básicos que máis beneficios aporta ao organismo. Contén aproximadamente unha media de 32g/L de proteína que parece variar segundo a marca ou o tipo (entero, semidesnatado e desnatado) o que se pode observar nos etiquetados obligatorios de información nutricional presentes nos envases. Estas variacións parecen atender a diferentes factores tanto ambientáis como propios do animal (alimentación, saúde, idade, etc.).

Un análise da cantidade de proteína en cada unha das marcas e tipos de leite sería un bó indicador da fiabilidade destes etiquetados, e ademáis, poderíase observar se existen

diferencias significativas na cantidade de proteína en cada unha das variables (Marcas e Tipo).

Nesta investigación realizouse un análise do nivel de proteína presente en catro marcas distintas (M1, M2, M3 e M4) e nos seus tres tipos de leite (enteiro, semidesnatado e desnatado). Como resultado obtívose que non existen diferenzas significativas no nivel de proteína (g/100mL) entre as catro marcas de leite analizadas e seus tres tipos. Con todo, ao analizar cada marca individualmente, detectáronse diferenzas na cantidade de proteína presente da leite semidesnatada respecto á cantidade de proteína do leite entero e desnatado da marca M2. Da mesma forma, detectáronse diferenzas no nivel de proteína do leite desnatado, semidesnatado e entero da marca M3.

**PALABRAS CRAVE:** Proteína - Caseína - Leite - Vaca - Enteiro - Semidesnatado - Desnatado - Marcas

## **SUMMARY**

Bovine milk is one of the staple foods that brings more benefits to the body. It contains approximately an average of 32g / L of protein that seems to vary according to the brand or type of milk (whole, semi-skimmed and skimmed) which can be observed in the obligatory labeling of nutritional information present in the containers. These variations seem to attend to various environmental and animal-specific factors (food, health, age, etc.).

An analysis of the level of protein in each of the brands and types of milk would be a good indicator of the reliability of these labels, and in addition, it could be observed if there are significant differences in the amount of protein in each of the variables (Brands and Types) In this investigation, an analysis of the level of protein present in four different brands (M1, M2, M3 and M4) and in its three types of milk (whole, semi-skimmed and skimmed) was carried out. As a result, it has been obtained that there are no significant differences in the protein level (g / 100mL) between the four milk brands analyzed and their three types. However, when analyzing each brand individually, differences have been detected in the amount of semi-skimmed milk protein with respect to the amount of protein in the whole and skimmed milk of the M2 brand. In the same way, differences were detected in the protein level of the skimmed, semi-skimmed and whole milk of the M3 brand.

**KEYWORDS:** Protein - Casein - Milk - Cow - Whole - Semi-skimmed - Skimmed - Brands

# 1. Introducción

La leche de vaca es una de las principales fuentes de proteína de la alimentación mundial (Grigg, 1995), pues un vaso de leche (250mL) aporta una media de un 15% de la proteína diaria recomendada (Véanse etiquetas superiores de la Figura 2). Tal y como se puede observar en la Figura 1, en España se consumen aproximadamente 70 litros de leche per cápita, de los cuales el 24% son de leche entera, el 29% se corresponde con la leche desnatada y el 47% con la leche semidesnatada (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018).

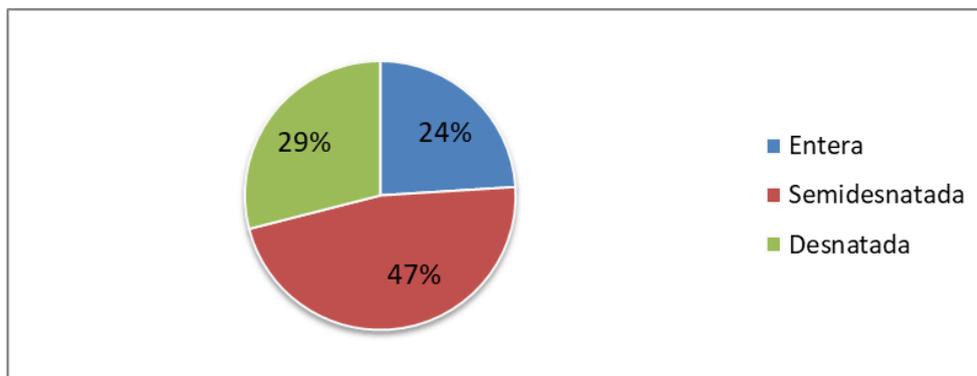


Figura 1. Diagrama de sectores que muestra el porcentaje de consumo per cápita de los tipos de leche en España.

En la Figura 2 aparecen representadas dos marcas de leche de vaca. Las tres imágenes superiores se corresponden con los tres tipos de leche (entera, semidesnatada y desnatada) de la primera marca, mientras que las tres imágenes inferiores se corresponden con los tres tipos de la segunda marca.

La principal diferencia entre los tipos de leche es el contenido en grasa pero, como se puede observar en las imágenes de la Figura 2, según la información nutricional presente en los envases de leche, también existe una variación en el contenido proteico (g/100mL). Además de la diferencia observada en el nivel de proteína entre los tres tipos de leche, se puede ver que dependiendo de la marca comercial también existe una variación en la cantidad de proteína.

Según el Reglamento (UE) nº 1169/2011, es obligatorio incluir en cada etiquetado de los alimentos los valores nutricionales de valor energético, las grasas, las grasas saturadas, los hidratos de carbono, los azúcares, la proteína y la sal. De esta manera se pueden comparar los distintos alimentos en función de su valor nutricional, y observar las posibles diferencias, lo que ha sido de gran importancia en este estudio.

ENTERA				SEMIDESNATADA				DESNATADA			
Información Nutricional				Información Nutricional				Información Nutricional			
	Por: 100ml	Un vaso de: 250ml	LR*		Por: 100ml	Un vaso de: 250ml	LR*		Por: 100ml	Un vaso de: 250ml	LR*
Valor energético	262 kJ 63 kcal	656 kJ 157 kcal	8%	Valor energético	192 kJ 46 kcal	480 kJ 114 kcal	6%	Valor energético	145 kJ 34 kcal	364 kJ 86 kcal	4%
Grasas de las cuales saturadas	3,6 g 2,2 g	9 g 5,5 g	13% 28%	Grasas de las cuales saturadas	1,6 g 1,1 g	4 g 2,8 g	6% 14%	Grasas de las cuales saturadas	<0,5 g 0,2 g	0,8 g 0,5 g	1% 3%
Hidratos de carbono de los cuales azúcar	4,6 g 4,6 g	12 g 12 g	4% 13%	Hidratos de carbono de los cuales azúcar	4,7 g 4,7 g	12 g 12 g	5% 13%	Hidratos de carbono de los cuales azúcar	4,8 g 4,8 g	12 g 12 g	5% 13%
Fibra alimentaria	0 g	0 g		Fibra alimentaria	0 g	0 g		Fibra alimentaria	0 g	0 g	
Proteínas	3 g	7,5 g	15%	Proteínas	3,1g	7,8 g	16%	Proteínas	3,1g	7,8 g	16%
Sal	0,13 g	0,33g	5%	Sal	0,13 g	0,33 g	5%	Sal	0,13 g	0,33g	5%

LECHE UHT ENTERA		VALORES MEDIOS POR 100ML LECHE UHT SEMIDESNATADA		VALORES MEDIOS POR 100ML LECHE UHT DESNATADA	
Valor energético...	264 KJ (63 Kcal)	Valor energético....	190 KJ (45 Kcal)	Valor energético....	144 KJ (34Kcal)
Grasas .....	3,6 g	Grasas .....	1,55 g	Grasas .....	0,25 g
de las cuales saturadas .....	2,4 g	de las cuales saturadas .....	1 g	de las cuales saturadas .....	0,17 g
Hidratos de carbono .....	4,6 g	Hidratos de carbono .....	4,65 g	Hidratos de carbono .....	4,7 g
de los cuales azúcares .....	4,6 g	de los cuales azúcares .....	4,65 g	de los cuales azúcares .....	4,7 g
Proteínas .....	3,1 g	Proteínas .....	3,15 g	Proteínas .....	3,2 g
Sal .....	0,1 g	Sal .....	0,1 g	Sal .....	0,1 g
Calcio .....	120 mg (15% VRN*)	Calcio .....	120 mg (15% VRN*)	Calcio .....	120 mg (15% VRN*)

Figura 2. Diferentes etiquetas de dos marcas diferentes con sus tres tipos de leche (entera, semidesnatada y desnatada), en las cuales se observan las diferencias en la cantidad de proteína (g/100mL).

### Las proteínas lácteas

Las proteínas presentes en la leche se diferencian principalmente en dos grupos: las caseínas, que representan el 80% de las proteínas totales, y las proteínas del suero que conforman el 20% restante (Alais, 1984). Ambos tipos se diferencian en que las caseínas tienen un punto isoeléctrico de 4,6, es decir, precipitan mediante la acidificación de la leche a un pH de 4,6 formando el cuajo, mientras que las proteínas del suero permanecen en la fracción soluble durante ese proceso. Por este motivo, una elevada concentración de caseína en leche es una buena característica para la elaboración de productos lácteos sólidos, como pueden ser el queso, la mantequilla, etc., y también, una mayor cantidad de esta proteína determina una mejor calidad del producto (Alais, 1984).

El consumo de leche, sobre todo en el período infantil, es muy importante debido a que las proteínas presentes ayudan al correcto funcionamiento y desarrollo del organismo. En los últimos años se ha asociado la ingesta de proteínas lácteas, tanto caseínas como proteínas del suero, con la disminución del riesgo de hipertensión (Jauhiainen & Korpela, 2007; Martínez-Maqueda *et al.*, 2012), con la estimulación de la síntesis muscular y el desarrollo de los tejidos, efectos positivos en la inflamación (Haug *et al.*, 2007) e incluso se ha sugerido que poseen un gran potencial anticancerígeno (Parodi, 2007).

Gracias a los efectos positivos de la fracción proteica de la leche en la salud humana se ha establecido una correlación positiva entre la calidad de la leche y la cantidad de proteína presente en ésta, sobre todo de caseínas (Alais, 1984) y, por este motivo, se han realizado diversas investigaciones acerca de qué factores pueden afectar a la composición proteica de la leche.

Así, se ha visto que las diferencias en el contenido proteico están altamente determinadas por la raza bovina (Krol *et al.*, 2011; Rodríguez-Bermúdez *et al.*, 2017) y, debido a esto, se han realizado cruces entre las distintas razas para alterar los niveles proteicos de la leche y con ello poder mejorar la calidad de ésta (Maurmayr *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha estudiado como afecta la estación anual a la concentración de la proteína de la leche, y se ha comprobado que la mayor concentración de proteína y caseína se corresponde con los meses de invierno, observándose un 6% de variación en la concentración de la proteína entre las estaciones de invierno y verano (Bernabucci *et al.*, 2015).

Otros factores que pueden alterar la composición proteica de la leche bovina, y con ello su calidad, son la alimentación, el estado de salud, la etapa de la lactancia del animal, etc. (Bobe *et al.*, 1999).

Existen diversos métodos para cuantificar la cantidad de proteína láctea de un producto, como el método Lowry, Kjeldahl, Bradford, u otros. De todos ellos se ha llegado a la conclusión de que el más eficaz es el método de Bradford, pues presenta una mayor sensibilidad para determinar las proteínas, es más sencillo y requiere un menor tiempo para realizar el análisis (Kamikaze *et al.*, 2003).

Debido al aumento de la información disponible en la población y a la gran cantidad de marcas de leche presentes en el mercado, es interesante conocer si existe alguna variación en el nivel de proteína presente en cada una de las marcas y tipos de leche, puesto que, como ya se ha mencionado anteriormente, existe una correlación positiva entre el nivel proteico de la leche y su calidad (Alais, 1984), lo cual conlleva un mayor beneficio para el organismo.

## **2. Objetivos**

1. El primer objetivo de esta investigación es cuantificar mediante el método de Bradford la cantidad de proteína total presente en las cuatro marcas de leche más consumidas en Galicia y en cada uno de sus tres tipos: entera, semidesnatada y desnatada y, a través de un análisis estadístico, observar si existen diferencias de la cantidad proteica entre ellas.
2. El segundo objetivo se centra en realizar una extracción y cuantificación de la caseína mediante el método de Bradford para determinar el porcentaje de ésta sobre la proteína total, y posteriormente observar si existen diferencias del porcentaje de caseína en las diferentes marcas y tipos de leche.

### **3. Material y métodos**

Para comparar la cantidad de proteína (g/100mL) se utilizaron cuatro marcas diferentes de leche bovina y sus tres tipos (entera, semidesnatada y desnatada) tomándose 10 muestras de cada marca y tipo.

Estas cuatro marcas se seleccionaron por ser las cuatro marcas más consumidas en Galicia, las cuales fueron denominadas M1, M2, M3 y M4 debido a la confidencialidad de datos. Estas cuatro marcas se distribuyen por los cuatro cuadrantes de calidad (muy buena, buena, media y mala) en un estudio realizado por la OCU "Las marcas de leche con mejor y peor calidad según la OCU" ("Diez marcas de leche que no debes consumir", 2011). Por otro lado, el hecho de que sean las marcas más consumidas ha facilitado la obtención de las muestras, tanto en cafeterías como en hogares.

#### **3.1. Recogida y toma de muestras**

Las muestras de leche se recogieron en viales de 10mL en diferentes días y en diferentes cafeterías y hogares. Durante la recogida de las muestras se anotó la cantidad de proteína del etiquetado de la leche, la fecha de recogida de la muestra y la fecha de caducidad, puesto que cada una de las muestras recogidas debía de proceder de diferente lote. La variación en la fecha de caducidad es un buen indicador de que las muestras pertenecen a diferentes lotes. Las muestras se mantuvieron en frío durante el transporte al laboratorio para evitar el crecimiento de microorganismos u otros factores que pudieran alterar el análisis. Una vez en el laboratorio, se realizó una precipitación parcial de la caseína. Tanto sobrenadante como precipitado (caseína) fueron congelados a -20°C hasta su procesamiento posterior. En todo momento se anotó la fecha de congelación.

#### **3.2 Procesamiento de las muestras**

Para procesar las muestras se siguió un protocolo estándar de extracción de proteínas, el cual fue optimizado durante el transcurso de este trabajo.

De la cantidad total de leche recogida, se separaron 100µL a un Eppendorf etiquetado como A1 para medir la proteína total.

Por otro lado se separaron a otro Eppendorf (B1) 400µL para proceder a la extracción de la caseína, siguiendo los siguientes pasos:

1. Se añadieron 50µL de ácido acético glacial al Eppendorf B1 y se mezcló por inversión para precipitar la caseína. El pH del ácido acético (4,6) hace precipitar la caseína, la cual tiene un punto isoeléctrico de 4,6.
2. Se centrifugó a 13000rpm durante 5 minutos.
3. Se retiró el sobrenadante y se transfirió en un Eppendorf etiquetado como S1. Se reservó para determinar la cantidad de proteína total no precipitada (proteína del suero).
4. El Eppendorf B1 que contiene la caseína precipitada se lavó someramente con 1000µL de agua destilada fría agitando en el vórtex para retirar el ácido acético.
5. Se centrifugó de nuevo a 13000rpm durante 2 minutos y posteriormente se descartó el agua.
6. Se añadieron 1000µL de NaOH 0,1M para redissolver el precipitado proteico y se centrifugó a 13000rpm durante 2 min.
7. Se recogió el sobrenadante, que contiene la fracción proteica y se descartó el precipitado. El sobrenadante se transfirió a un Eppendorf etiquetado como B2.
8. Se precipitó de nuevo la caseína del sobrenadante del Eppendorf B2 añadiendo 50µL de ácido acético y centrifugando a 13000rpm durante 2 minutos.
9. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1000µL de agua destilada fría.
10. Para redissolver el precipitado se añadieron 1000µL de NaOH 0,1M.
11. Para la posterior medida de proteína se prepararon tres Eppendorf etiquetados como A2, B3 y S2, en los cuales se procedió a realizar las diluciones 1:100 de los Eppendorf A1 (proteína total), B2 (caseína precipitada) y S1(proteínas del suero no precipitadas), respectivamente.

Con el fin de averiguar si el proceso de precipitación y congelación pudiese alterar la cuantificación de proteínas totales de las muestras, se efectuó una cuantificación de la proteína de una misma tanda de muestras antes y después de haber sido procesadas. La comparación de los resultados arrojó una concentración de proteína igual entre la leche sin procesar y la suma del precipitado (caseína) y sobrenadante (proteínas del suero) en todas las muestras.

### **3.3 Determinación de proteína total y caseína**

Se realizó una determinación de la proteína mediante el método de Bradford. Para ello se siguió un protocolo estándar de determinación de proteínas basado en el método de Bradford de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución de reactivo Bradford de la casa comercial Bio-Rad en proporción 1:5 con agua bidestilada.
2. Se preparó la recta patrón utilizando la proteína estándar Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1mg/mL. Para ello se realizaron diluciones con agua Milli-Q, obteniendo finalmente unas concentraciones de 0mg/mL, 0,2mg/mL, 0,4mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8mg/mL y 1mg/mL.
3. La medida se realizó en una placa de 96 pocillos. Para la recta patrón se añadieron las diluciones de BSA preparadas anteriormente. Las muestras previamente diluidas A2, B3 y S2 se añadieron a los pocillos junto con el reactivo de Bradford (casa comercial Bio-Rad) el cual se usó en una proporción 1:20.
4. Se midió la absorbancia a 595nm en un lector multi-modal de microplacas Synergy H1, utilizando como blanco agua bidestilada.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia se realizaron los cálculos necesarios para obtener la cantidad de proteína total y caseína en g/100mL de las muestras analizadas.

### **3.4 Determinación del tamaño muestral**

Inicialmente se tomaron 36 muestras de leche de las 4 marcas seleccionadas (M1, M2, M3 y M4) distribuidas en 3 muestras por cada marca y tipo de leche (entera, semidesnatada y desnatada) para realizar un experimento piloto con el propósito de estimar la variabilidad del nivel de proteína en leche, uno de los parámetros necesarios para determinar el tamaño muestral mínimo que garantiza una elevada potencia estadística en el análisis. Fue necesaria la realización del mismo por la falta de estudios previos similares que proporcionasen información sobre la distribución de los niveles de proteína en diferentes marcas y tipos de leche de vaca.

Para las muestras obtenidas, se realizó el procedimiento de extracción y cuantificación de proteína, en el cual se precipita la caseína mediante acidificación y se miden los niveles de proteína presentes tanto en precipitado (caseína) como en el sobrenadante (proteínas del suero). Una vez obtenidos los datos se ajustó un modelo lineal para explicar la proteína en función de la Marca y Tipo de leche obteniéndose una estimación  $1-\beta$  en la resolución del test ANOVA, que permite estudiar el efecto de la Marca y Tipo de leche sobre el nivel de Proteína. Se aplicó la función `pwr.anova.test()` del paquete `pwr` del software R que implementa el procedimiento de determinación del tamaño muestral propuesto en el libro *Statistical power analysis for the behavioral sciences* de Cohen. Tal como se puede ver en la Figura 3, la aplicación de este procedimiento requiere fijar los parámetros  $k$  (número de grupos),  $\delta$  (utilizado para obtener  $f$ ),  $\text{sig.level}$  y  $\text{power}$ .

```
Balanced one-way analysis of variance power calculation

      k = 12
      n = 10.08793
      f = 0.3892495
sig.level = 0.05
  power = 0.8

NOTE: n is number in each group
```

Figura 3. Salida de la función `pwr.anova.test()` en el cual nos indica el tamaño muestral mínimo en cada grupo ( $n=10$ ) atendiendo al número de grupos ( $k=12$ ), nivel de significación ( $\text{sig.level}=0,05$ ), potencia estadística ( $\text{power}=0,8$ ) y el tamaño del efecto ( $\delta=0,2$ ).

Se fijó un nivel de significación de  $\alpha=0,05$  y una potencia estadística ( $1-\beta$ ) de 0,8, ya que son los valores apropiados para lograr un equilibrio entre los errores de tipo I y tipo II en la realización del test estadístico (Quezada, 2007). Los errores de tipo I y de tipo II de un test de hipótesis estadístico, también denominados  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, se dan cuando se rechaza la  $H_0$  siendo verdadera, o cuando se acepta la  $H_0$  siendo ésta falsa, respectivamente (Quezada, 2007). En nuestro caso, la hipótesis nula establece que no hay diferencias significativas entre los distintos parámetros (Marcas y Tipos de leche). De esta manera al asumir  $\alpha=0,05$  y  $1-\beta=0,8$ , la probabilidad de incurrir en alguno de estos tipos de error es baja. Otro parámetro necesario en la determinación del tamaño muestral es el valor delta (menor diferencia significativa que se quiere detectar) que se fijó como 0,2 ya que, aunque según el etiquetado de las muestras una variación de 0,1 sería una diferencia significativa, los valores de proteína mostrados en la etiqueta son valores mínimos.

Así pues, partiendo de una varianza estimada de 0,011 y dado que disponemos de 4 niveles para el factor Marca y 3 para el factor Tipo ( $k=12$ ), para tener un 80% de potencia estadística, cuando el tamaño del efecto buscado es de 0,2 y el nivel de significación de 0,05, es preciso disponer de un tamaño muestral mínimo de 10 muestras por grupo, tal como se puede ver en la Figura 3, obteniendo finalmente 120 muestras de leche.

### **3.5. Análisis estadístico de los datos**

Para realizar el análisis de los datos, se tomaron 120 muestras de leche procedentes de cuatro marcas y los tres tipos básicos (entera, semidesnatada y desnatada), sobre los que se ha medido el nivel total de proteína en g/100mL.

En primer lugar se realizó un análisis exploratorio de las variables numéricas (Proteína y Caseína) consistente en la obtención de representaciones gráficas, cálculo de medidas descriptivas, análisis de la normalidad mediante el test de Shapiro Wilks y obtención de intervalos de confianza para las medias para cada uno de los grupos.

Con el propósito de determinar el efecto de la Marca así como del Tipo en la cantidad de proteína presente, se planteó un modelo ANOVA con dos factores de tratamiento de efectos fijos e interacción entre los mismos, puesto que ésta se observó mediante el gráfico de interacción realizado en el análisis exploratorio descriptivo:

- El factor Marca con 4 niveles (M1, M2, M3 y M4)
- El factor Tipo con 3 niveles (E=entera, S=semidesnatada y D=desnatada).

La variable respuesta, denotada por  $Y$  a lo largo del documento, es el nivel total de Proteína (g/100mL) que fue determinada en cada una de las 10 muestras de cada combinación de Marca y Tipo (variables cualitativas), disponiendo de este modo de un diseño balanceado. Para la comprobación de las hipótesis estructurales del modelo, la normalidad y la homocedasticidad, se calcularon los residuos y se aplicaron los test de Lilliefors (>50 datos) y el test de Levene, respectivamente.

Por último, como métodos de contrastes múltiples para detectar diferencias significativas de los niveles proteicos entre los diferentes grupos considerados, se aplicaron los test de Tukey y Duncan junto con sus representaciones gráficas. El análisis estadístico fue realizado usando el software RStudio (v 1.2.1335).

## 4. Resultados

### 4.1. Resultados de la determinación de proteína total

Un análisis previo de los datos muestra unos valores de medias y desviaciones típicas muestrales muy similares, no observándose grandes diferencias entre tipos y marcas de leche, tal y como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Medias y desviaciones típicas entre paréntesis de la variable Proteína en cada combinación Marca y Tipo.

#### Medias y desviaciones típicas

	M1	M2	M3	M4
Entera	3,189 (±0,175)	3,141 (±0,164)	3,310 (±0,191)	3,287 (±0,148)
Semidesnatada	3,156 (±0,227)	3,297 (±0,123)	3,165 (±0,197)	3,181 (±0,173)
Desnatada	3,276 (±0,235)	3,134 (±0,129)	3,052 (±0,248)	3,295 (±0,179)

Cómo se puede observar en la Figura 4, parece existir una interacción entre los factores Marca y Tipo, de manera que la cantidad de proteína media para cada tipo de leche no se comporta igual dentro de las distintas marcas. Por esta razón, este análisis está enfocado a determinar las diferencias de proteína en la leche teniendo en cuenta el efecto de los factores (Marca y Tipo) así como la interacción en los mismos.

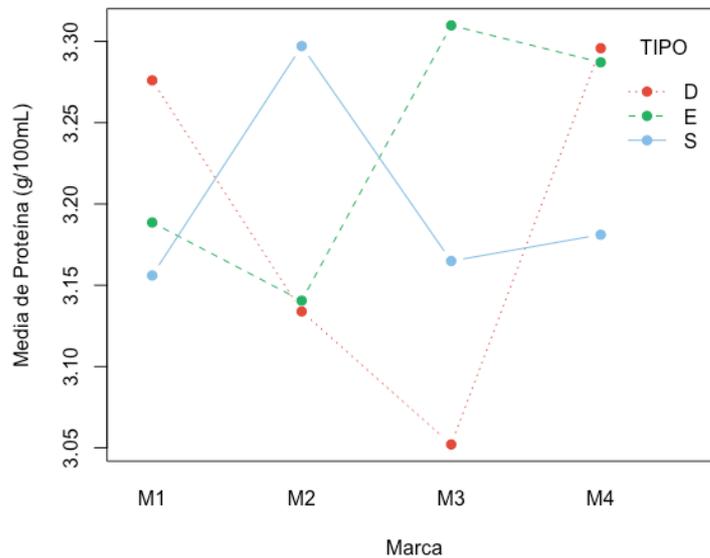


Figura 4. Gráfico de interacción que representa la media de la proteína (g/100mL) frente al factor Marca teniendo en cuenta al factor Tipo. M1, M2, M3 y M4 son marca 1, 2, 3 y 4 respectivamente, mientras que E=entera, S=semidesnatada y D=desnatada.

Como ya se ha mencionado en la Tabla 1, las medias de las 12 combinaciones de leche (cada marca con un tipo de leche), son muy similares, sin embargo mediante la Figura 5, que muestra la distribución del nivel de proteína en los grupos, se puede observar en más detalle que la marca M3 desnatada (M3:D) presenta su cuantil del 25% más bajo que el resto de combinaciones de leche, en concreto, el 25% de las muestras tienen unos valores de proteína menores a 3,0g/100mL. También se observa que, en general, los datos presentan una variabilidad similar en los distintos grupos.

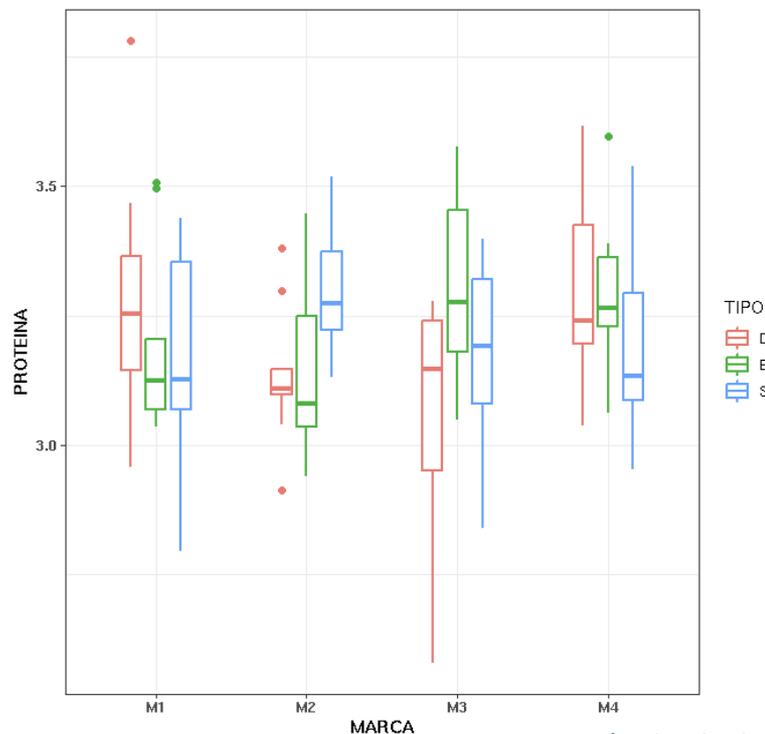


Figura 5. Diagramas de cajas donde se representan la cantidad de proteína (mg/mL) de las 4 marcas y 3 tipos de leche. M1, M2, M3 y M4 son marca 1, 2, 3 y 4 respectivamente, mientras que E=entera, S=semidesnatada y D=desnatada.

Para determinar si nuestros datos siguen una distribución normal se realiza el test de normalidad de Shapiro (<30 muestras) con corrección de Holm para p-valores. Los resultados obtenidos (véase Tabla 2) nos indican que nuestros datos parecen seguir una distribución normal, excepto en el caso de la marca M1 de tipo entera, la cual presenta un p-valor<0.05 (0,008). Sin embargo, el p-valor corregido por Holm indica que se puede mantener la normalidad en cada una de las combinaciones.

Tabla 2. P-valores obtenidos con el test de Shapiro-Wilks (<30 datos) con corrección de Holm (P-valor ajustado).

\*p-valor significativo (<0.05)

Marcas	Tipo	P-valor no ajustado	P-valor ajustado
<b>M1</b>	Entera	0,008*	0,103
	Semidesnatada	0,281	1,000
	Desnatada	0,631	1,000
<b>M2</b>	Entera	0,457	1,000
	Semidesnatada	0,874	1,000
	Desnatada	0,289	1,000
<b>M3</b>	Entera	0,499	1,000
	Semidesnatada	0,305	1,000
	Desnatada	0,065	0,714
<b>M4</b>	Entera	0,748	1,000
	Semidesnatada	0,568	1,000
	Desnatada	0,552	1,000

Para completar la estimación puntual obtenida para las medias de los niveles de proteína en los distintos grupos (Tabla 1), se ha procedido a obtener los intervalos de confianza correspondientes al 95%, que se han representado en la Figura 6. En esta gráfica se muestran los valores entre los que varían las medias de proteína así como un claro solapamiento entre las distintas combinaciones Marca/Tipo. Dentro de la marca M2 parece intuirse niveles medios más elevados en la leche de tipo semidesnatada y en la marca M3 niveles más bajos de proteína en el tipo desnatada.

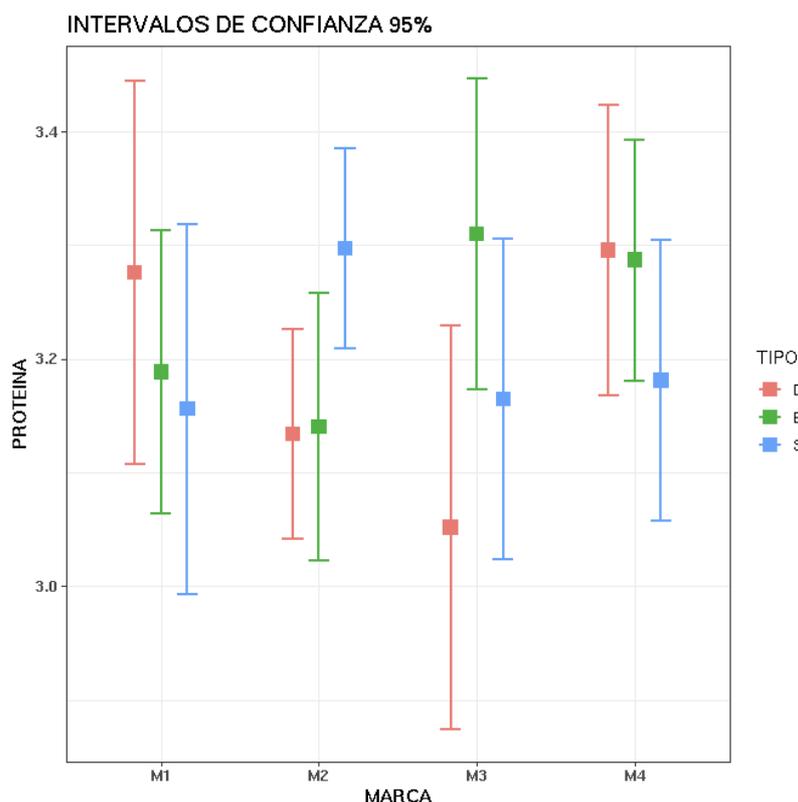


Figura 6. Gráfico representativo de los intervalos de confianza al 95% de cada marca y tipo frente a la cantidad de proteína (mg/100mL). M1, M2, M3 y M4 son marca 1, 2, 3 y 4 respectivamente, mientras que E=entera, S=semidesnatada y D=desnatada.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA II) se ha detectado interacción significativa al 5% entre los factores Marca y Tipo ( $p$ -valor=0,009754), corroborándose, de esta forma, lo anteriormente visto por el gráfico de interacción (Figura 4). Por este motivo, no es posible comparar los factores Marca y Tipo individualmente, siendo necesario combinar ambos factores y estudiar las posibles diferencias entre los mismos.

Para comprobar la validez del ANOVA es necesario chequear los residuos del modelo y comprobar si presentan normalidad y homocedasticidad. El test de normalidad de los residuos de Lilliefors arroja un  $p$ -valor de 0,4817, con lo cual se puede mantener la hipótesis nula de distribución normal de los datos.

La homocedasticidad fue chequeada por el test de Levene mostrando un  $p$ -valor de 0,659, de manera que tanto los residuos como los niveles de proteína presentan homocedasticidad, es decir, una variabilidad similar.

Para visualizar como difiere la cantidad de proteína entre las distintas combinaciones Marca-Tipo se realizó un análisis de contrastes múltiples mediante el test de Tukey, el cual no detectó diferencias significativas entre las medias.

Posteriormente, se realizó el test de Duncan para comprobar si este test, al ser menos conservador que el test de Tukey, detectaba alguna diferencia significativa entre las medias de las combinaciones. Los resultados arrojaron diferencias significativas entre las medias de la marca M3 desnatada (M3-D) respecto a la misma marca de tipo entera (M3-E), a la marca M1 desnatada (M1-D), a la marca M2 semidesnatada (M2-S) y a la marca M4 desnatada y entera (M4-D y M4-E), tal como se puede ver en la Tabla 3.

Tabla 3. P-valores resultantes del test de Duncan para cada combinación Marca/Tipo.  
P-valor significativo < 0,05

Combinaciones	P-valor
<b>M1:D-M3:D</b>	0,021
<b>M2:S-M3:D</b>	0,013
<b>M3:D-M3:E</b>	0,009
<b>M3:D-M4:D</b>	0,013
<b>M3:D-M4:E</b>	0,016

Debido a las diferencias encontradas, se procedió a analizar cada tipo de leche seleccionando cada marca por separado para observar si existen diferencias en el nivel de proteína entre los tipos de leche dentro de cada marca.

Para ello se realizó el ANOVA I para cada marca, dando como resultado diferencias significativas en las marcas M2 y M3, tal y como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. P-valores resultantes del ANOVA I para cada marca de leche.  
\*p-valores significativos al 0.05.

Marcas	P-valor
<b>Marca 1</b>	0,443
<b>Marca 2</b>	0,023*
<b>Marca 3</b>	0,039*
<b>Marca 4</b>	0,251

Dentro de la marca M1 y M4 el nivel de proteína en los distintos tipos de leche es similar, sin embargo se ha detectado una cierta diferencia en las marcas M2 y M3 (véase Tabla 4). Por este motivo, se realiza el test de Tukey de las marcas M2 y M3 para comprobar entre qué tipos de leche existen diferencias.

El test de Tukey indica que en las marcas M1 y M4 no hay diferencias entre las medias de proteína de las muestras de cada tipo ya que el test arroja unos p-valores no significativos ( $p\text{-valor} > 0,05$ ), lo que se puede corroborar al observar los gráficos pertenecientes a M1 y M4 de la Figura 7, puesto que cada uno de los tipos (entera, semidesnatada y desnatada) se asignan a un solo grupo (grupo a).

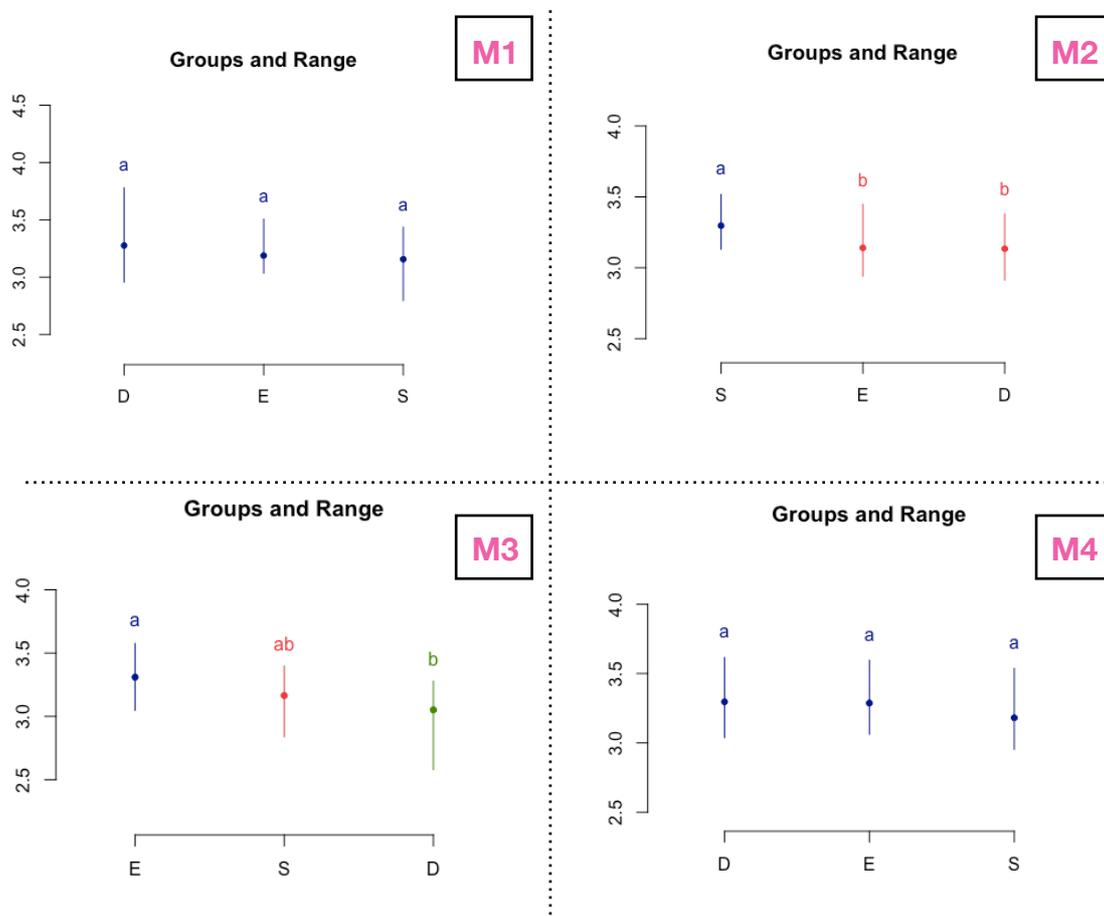


Figura 7. Gráficos del test de Tukey para cada una de las 4 marcas (M1, M2, M3 y M4). Se representan los intervalos de confianza al 95% y mediante el punto, las medias de cada tipo de leche (E=entera, S=semidesnatada y D=desnatada) y, dependiendo de las variaciones encontradas, se asigna cada tipo de leche a un grupo (a, b).

Por otro lado, dentro de la marca M2 se observan diferencias entre la leche semidesnatada con respecto a la leche entera y desnatada. El test de Tukey nos indica que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre las comparaciones de leche desnatada-semidesnatada ( $p$ -valor=0,037) y entre las comparaciones de leche entera-semidesnatada ( $p$ -valor=0,047). Si se observa el gráfico correspondiente a M2 de la Figura 7, se puede intuir que los valores medios de proteína de la leche semidesnatada, asignada al grupo *a*, son mayores que los valores medios de proteína asociados a los tipos de leche desnatada y entera, y por ello a estos dos tipos (desnatada y entera) los agrupa en otro grupo, el grupo *b*.

Por último, el test de Tukey ha rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias para la comparación entre el tipo de leche desnatada-entera ( $p$ -valor=0,031) de la marca M3. En el gráfico asociado a la marca M3 se puede ver que hay una distinción entre los tipos de leche entera y desnatada, agrupándolos en el grupo *a* y en el grupo *b*, respectivamente. Por otro lado en el caso de la leche semidesnatada, la agrupa en el grupo *ab*, lo cual indica que la media de proteína de la leche semidesnatada de la marca M3 es similar a la media de la proteína tanto de la leche entera como desnatada, sin embargo, la leche entera contiene una media de proteína diferente a la leche desnatada. Así, se observa que la leche entera presenta un nivel medio de proteína mayor, la leche desnatada presenta la menor cantidad de proteína, mientras que la leche semidesnatada presenta un valor de proteína intermedio entre ambas.

## 4.2. Resultados del porcentaje de caseína

Un análisis previo de los datos muestra unos valores medios del porcentaje de caseína similares en las distintas marcas y tipos de leche, tal y como se puede ver en la Tabla 5.

Tabla 5. Medias del porcentaje de la variable %Caseína en cada combinación Marca y Tipo.

Porcentajes medios Caseína				
	M1	M2	M3	M4
Entera	73,9	72,9	69,3	67,5
Semidesnatada	72,7	65,5	70,7	71,4
Desnatada	69,1	73,9	72,6	68,2

Se realizó un ANOVA II para los factores Marca y Tipo y la variable %caseína para observar las diferencias que puedan existir en los porcentajes de caseína presentes en la proteína respecto a cada marca y tipo de leche.

El análisis de varianza mostró resultados no significativos tanto para la interacción entre Marca y Tipo ( $p$ -valor=0,238), como para el efecto individual de cada factor ( $p$ -valor=0,668 y  $p$ -valor=0,881, respectivamente), de manera que las varianzas medias entre el porcentaje de caseína y los distintos tipos (entera, semidesnatada y desnatada) y distintas marcas (M1, M2, M3 y M4), son similares.

Posteriormente se chequearon la normalidad y homocedasticidad de los residuos mediante el test de Lilliefors y el test de Levene. Se observó que los residuos presentaban homocedasticidad, sin embargo no seguían una distribución normal. Por este motivo se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Este test arrojó un resultado similar al obtenido por el ANOVA, puesto que no se encontraron diferencias significativas para la interacción entre Marca y Tipo ( $p$ -valor=0,554), ni para el efecto individual de cada factor Marca y Tipo ( $p$ -valor=0,638 y  $p$ -valor=0,420, respectivamente).

La media del porcentaje de caseína presente en la proteína arroja un valor del 71%.

## 5. Discusión

En la Tabla 1 se puede observar que las medias de cantidad de proteína total (g/100mL) en las diferentes marcas y tipos de leche superan la cantidad mínima exigida por la Norma General de Calidad para la Leche UHT, la cual es de 2,80 g/100mL para la leche entera, 2,85 g/100mL para la leche semidesnatada y 2,9 g/100mL para la leche desnatada (Orden de 11 de febrero de 1987 por la que se modifica la Norma General de Calidad para la Leche UHT).

La comparación entre los valores de proteína presentes en el etiquetado de cada una de las marcas (M1, M2, M3 y M4) y tipos de leche (entera, semidesnatada y desnatada) y los valores de proteína obtenidos en este experimento representados en la Tabla 6, muestra que todos los valores determinados experimentalmente son mayores que los mostrados en la etiqueta, a excepción de las muestras de leche pertenecientes a la marca M3 de tipo desnatada, la cual indica en su etiquetado que contiene un mínimo de proteína (g/100mL) de 3,2, mientras que en este experimento se ha revelado una cantidad de 3,052 g/100mL.

Tabla 6. Valores de proteína en g/100mL presentes en cada una de las etiquetas de los distintos tipos y marcas de leche. Entre paréntesis las medias de la cantidad de proteína determinada en el experimento.

### Valores mínimos de proteína

	M1	M2	M3	M4
Entera	3,0 (3,189)	3,0 (3,141)	3,1 (3,310)	3,1 (3,287)
Semidesnatada	3,0 (3,156)	3,1 (3,297)	3,15 (3,165)	3,1 (3,181)
Desnatada	3,1 (3,276)	3,1 (3,134)	3,2 (3,052)	3,2 (3,295)

Todos los valores obtenidos experimentalmente son mayores que los indicados en la etiqueta, lo cual es razonable porque los valores presentes en las etiquetas son valores mínimos que pueden alcanzar (consulta personal al personal de una lechería) debido a distintas variaciones como la alimentación del animal, estación anual, salud, etc., como ya han mencionado diversos autores (Krol *et al.*, 2011; Bernabucci *et al.*, 2015).

El análisis estadístico muestra que no hubo diferencias significativas entre las distintas marcas, ni entre los distintos tipos de leche a diferencia de otros estudios en los cuales si encontraron diferencias de proteína entre distintas marcas (Briñez *et al.*, 2002), sin embargo, al analizar cada marca individualmente, se observó que existen leves

diferencias en la cantidad de proteína entre los distintos tipos de leche dentro de las marcas M2 y M3 (véase Tabla 4).

De esta forma, se vio que en la marca M2, la leche semidesnatada difiere significativamente de la leche entera y desnatada, mostrando un nivel medio de proteína mayor que ambas. La leche entera y desnatada de la marca M2 no mostraron diferencias en el nivel de proteína, siendo ambas cantidades similares.

Por otro lado, en la marca M3, los valores de proteína en los tipos de leche entera y desnatada difieren (p-valores significativos), sin embargo, ambos presentaban una cantidad de proteína similar a la leche semidesnatada. De esta manera, se observa que la leche entera tiene un valor medio proteico superior a la leche desnatada.

Por último, el porcentaje de caseína presente en cada marca y tipo de leche no presentó diferencias significativas en ninguna de las combinaciones, con lo cual el porcentaje es similar en cada una de las marcas y tipos, independientemente de la cantidad de proteína. Este resultado es razonable pues la proteína total contiene aproximadamente un 80% de caseína (Alais, 1984), y por lo tanto, en este caso, no debería de variar según las marcas y los tipos de leche. No obstante, cabe mencionar que un aumento del nivel de proteína conlleva un aumento de la caseína, y por ello cabría esperar que los tipos o marcas de leche con un mayor nivel de proteína presenten un nivel mayor de caseína.

El valor medio experimental del porcentaje de caseína presente en la proteína fue de un 71%, lo cual podría deberse a que durante el experimento se haya perdido caseína, al quedar ésta en el material usado, como puntas de pipetas o incluso en los sobrenadantes descartados.

## 6. a. Conclusiones

Según los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los objetivos de esta investigación, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- No existen diferencias significativas en el nivel de proteína entre las distintas marcas de leche M1, M2, M3 y M4, ni entre los distintos tipos de leche (entera, semidesnatada y desnatada), sin embargo, al estudiar las marcas individualmente se ha visto que el contenido proteico medio varía dependiendo del tipo de leche dentro de cada marca. Concretamente, dentro de la marca M2, la leche semidesnatada muestra un valor medio superior al de la leche entera y desnatada, mientras que dentro de la marca M3 se observa una mayor cantidad de proteína en la leche entera respecto a la desnatada.
- El porcentaje de caseína es aproximadamente de un 71% en todas las marcas y tipos de leche, el cual no varía respecto a las diferentes marcas y tipos de leche, sin embargo, debido a que el porcentaje de caseína es estable, se espera que exista una mayor cantidad de caseína en las marcas y tipos de leche que contienen un mayor nivel de proteína.

## 6.b. Conclusión

Segundo los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los objetivos de esta investigación, obtuvieron las siguientes conclusiones:

- No existen diferencias significativas en el nivel de proteína entre las diferentes marcas de leche M1, M2, M3 y M4, ni entre los distintos tipos de leche (entera, semidesnatada y desnatada), con todo, al estudiar las marcas individualmente observase que el contenido proteico medio varía dependiendo del tipo de leche dentro de cada marca. Concretamente, dentro de la marca M2, el leche semidesnatada muestra un valor medio superior al del leche entero y desnatado, mientras que en la marca M3 obsérvase una diferencia en la cantidad de proteína del leche entero respecto al desnatado, siendo mayor el nivel de proteína en el leche entero.
- El porcentaje de caseína es aproximadamente de un 71% en todas las marcas y tipos de leche, el cual no varía respecto a las diferentes marcas y tipos de leche, con todo, debido a que el porcentaje de caseína es estable, espérase que exista una mayor cantidad de caseína en las marcas y tipos de leche que contienen un mayor nivel de proteína.

## 6.c. Conclusions

According to the results obtained and taking into account the objectives of this research, the following conclusions have been obtained:

- There are no significant differences in the protein level between the different brands of milk M1, M2, M3 and M4, nor between the different types of milk (whole, semi-skimmed and skimmed), however, when studying the individual brands it has been seen that the average protein content varies depending on the type of milk within each brand. Specifically, within the M2 brand, semi-skimmed milk shows an average value higher than that of whole and skimmed milk, while within the M3 mark a greater amount of protein is observed in whole milk compared to skimmed milk.
- The percentage of casein is approximately 71% in all brands and types of milk, which does not vary with respect to different brands and types of milk, however, because the percentage of casein is stable, it is expected to exist a greater amount of casein in the brands and types of milk that contain a higher level of protein.

## 7. Bibliografía

- Alais, C. (1984). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera* (4th ed.). México. Compañía Editorial Continental.
- Bernabucci, U., Basiricò, L., Morera, P., Dipasquale, D., Vitali, A., Piccioli Cappelli, F., & Calamari, L. (2015). Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1815–1827. doi:10.3168/jds.2014-8788
- Bobbe, G., Beitz, D. C., Freeman, A. E., & Lindberg, G. L. (1999). Effect of Milk Protein Genotypes on Milk Protein Composition and Its Genetic Parameter Estimates. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2797–2804. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75537-2
- Briñez, W. J., Valbuena, E., Castro, G., Fuentes, F., González, D., & Tovar, A. (2002). Calidad físico química de las principales marcas de leche pasteurizada consumidas en la ciudad de Maracaibo. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 12(3), 221–230. Recuperado de <https://www.researchgate.net>
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Diez marcas de leche que no debes consumir. (2011). Recuperado de <https://www.conmuchagula.com/la-ocu-desaconseja-comprar-diez-marcasde-leche>.
- Grigg, D. (1995). The pattern of world protein consumption. *Geoforum*, 26(1), 1–17. doi:10.1016/0016-7185(94)00020-8
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25. doi:10.1186/1476-511X-6-25
- Jauhiainen, T., & Korpela, R. (2007). Milk Peptides and Blood Pressure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 825S-829S. doi:10.1093/jn/137.3.825S
- Kamizake, N. K. ., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. ., & Zaia, D. A. . (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(4), 507–516. doi:10.1016/S0889-1575(03)00004-8
- Krol, J., Brodziak, A., Litwinczuk, A. (2011). Basic chemical composition and content of selected whey proteins in milk from different cow breeds and in rennet whey. *Zywnosc. Nauka. Technologia Jakosc* (Food Science Technology Quality), 18(4), 74–83. doi:10.15193/zntj/2011/77/074-083
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, 3(4), 350-361. doi:10.1039/C2FO10192K
- Maurmayr, A., Pegolo, S., Malchiodi, F., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2018). Milk protein composition in purebred Holsteins and in first/second-generation crossbred cows from Swedish Red, Montbeliarde and Brown Swiss bulls. *Animal*, 12(10), 2214–2220. doi:10.1017/S1751731117003640

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018). *Informe del consumo de alimentación en España 2017*. Recuperado de [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-ycomercializacion-y-distribucionalimentaria/informeconsumoalimentacionenespana2017\\_prefinal\\_tcm30-456186.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-ycomercializacion-y-distribucionalimentaria/informeconsumoalimentacionenespana2017_prefinal_tcm30-456186.pdf)
- Orden de 11 de febrero de 1987 por la que se modifica la Norma General de Calidad para la Leche UHT. *Boletín Oficial del Estado*, 44, de 20 de febrero de 1987, 5113 a 5115. Recuperado de [https://www.boe.es/eli/es/o/1987/02/11/\(8\)# analisis](https://www.boe.es/eli/es/o/1987/02/11/(8)# analisis)
- Parodi, P. W. (2007). A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 813–828. doi:10.2174/138161207780363059
- Quezada, C. (2007). Potencia estadística, sensibilidad y tamaño de efecto: ¿un nuevo canon para la investigación? *ONOMÁZEIN*, 16(2), 159–170. Recuperado de <http://onomazein.letras.uc.cl>
- Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*. Bruselas. 22 de noviembre de 2011, núm. L304, pp. 18-63. Recuperado de <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- Rodríguez-Bermúdez, R., Miranda, M., Orjales, I., Rey-Crespo, F., Muñoz, N., & López-Alonso, M. (2017). Holstein-Friesian milk performance in organic farming in North Spain: Comparison with other systems and breeds. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), e0601. doi:10.5424/sjar/2017151-10037
- RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.