

UNIVERSIDAD NACIONAL
Campus Omar Dengo
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

Proyecto de graduación en la modalidad de proyecto de graduación

“ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES EN EL PROCESO DE UNA
EMPRESA PRODUCTORA DE PREMEZCLAS ALIMENTICIAS GRANULADAS”

Joel Josué Ramírez Alfaro

Tutor:

Máster Rolando Alberto Sánchez Gutiérrez

Asesores:

Dr. José Ángel Rodríguez Corrales

Lic. Elsie Loria Murillo

Heredia, Costa Rica

Abril, 2022

"Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial"

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

| | <u>NOMBRE</u> | <u>FIRMA</u> |
|--|--|--------------|
| Representante del Decanato | <u>Dr. Manuel Sandoval Barrantes</u> | _____ |
| Representante de la Dirección de la Escuela | <u>M.Sc. Rosa Alfaro Solís</u> | _____ |
| Tutor | <u>M.Sc. Rolando Sánchez Gutiérrez</u> | _____ |
| Asesor | <u>Dr. José Ángel Rodríguez Corrales</u> | _____ |
| Asesora | <u>Licda. Elsie Loría Murillo</u> | <u>ELM</u> |
| Lector | <u>M.Sc. Orlando Armijo Montes</u> | _____ |
| Proponente | <u>Bach. Joel Ramírez Alfaro</u> | _____ |

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| TABLA DE CONTENIDO | iii |
| INDICE DE CUADROS..... | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ÍNDICE DE ANEXOS | vi |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes y justificación | 1 |
| 1.1.1 Importancia nutricional..... | 2 |
| 1.1.2 Empresa productora de premezclas | 3 |
| 1.2 Marco teórico..... | 4 |
| 1.2.1 Descripción de la premezcla..... | 4 |
| 1.2.2 Zinc (Zn) y manganeso (Mn)..... | 5 |
| 1.2.3 Metodologías para el análisis de minerales en alimentos..... | 7 |
| 1.2.4 Definiciones..... | 9 |
| 1.2.5 Validación de métodos | 11 |
| CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 13 |
| 2.1 Objetivo general..... | 13 |
| 2.2 Objetivos específicos y actividades | 14 |
| 2.3 Hipótesis | 15 |
| III. METODOLOGÍA..... | 15 |
| 3.1 Análisis de zinc y manganeso..... | 15 |
| 3.2 Validación del método de análisis | 16 |
| 3.3 Diseño experimental de Youden-Steiner | 18 |
| 3.4 Muestreo | 19 |
| 3.5 Análisis de datos | 20 |
| 3.6 Control estadístico de proceso | 21 |
| 3.7 Informe a la empresa..... | 21 |
| CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 21 |
| 4.1 Análisis retrospectivo..... | 21 |
| 4.1.1 Aplicación de control estadístico a los datos retrospectivos | 26 |
| 4.1.2 Desempeño eliminado valores atípicos | 31 |

| | | |
|--|---|----|
| 4.2 | Validación..... | 33 |
| 4.2.1 | Robustez: | 34 |
| 4.2.2 | Linealidad y ámbito de trabajo | 35 |
| 4.2.3 | Límite de detección y cuantificación..... | 36 |
| 4.2.4 | Recuperación, veracidad y especificidad..... | 38 |
| 4.2.5 | Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)..... | 40 |
| 4.2.6 | Efecto Matriz | 42 |
| 4.3 | Análisis de datos obtenidos mediante el método validado | 43 |
| 4.3.1 | Control estadístico de las muestras..... | 47 |
| CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES | | 49 |
| CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 52 |
| CAPÍTULO VI. ANEXOS | | 62 |

INDICE DE CUADROS.

| | | |
|------------------|---|----|
| Cuadro 1. | Costa Rica: Valor de los principales productos exportados por el sector pecuario. 2019, 2020, 2021. | 2 |
| Cuadro 2. | Descripción general de las funciones de los minerales traza, requerimientos y nivel máximo tolerable | 5 |
| Cuadro 3. | Parámetros de desempeño mínimos a revalidar cuando se da una modificación a un método normalizado. | 13 |
| Cuadro 4 | Objetivos específicos y actividades..... | 14 |
| Cuadro 5. | Parámetros de desempeño, modo de evaluación y criterios de aceptación para la validación del método de análisis de zinc y manganeso en premezclas alimenticias bovinas y avícolas. | 16 |
| Cuadro 6. | Diseño experimental de Youden-Steiner..... | 18 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 7. Factores críticos identificados y variaciones aplicadas para evaluación de robustez..... | 34 |
| Cuadro 8. Límites de detección y cuantificación para curvas de calibración de zinc y manganeso. | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución de los datos de desempeño con respecto a los factores metal y carga. | 23 |
| Figura 2. Dispersión de la variable desempeño con respecto al factor categoría..... | 24 |
| Figura 3. Comparación del cumplimiento de las muestras estudiadas en relación con los límites máximos establecidos de la empresa. (A. Cumplimiento por metal, B. Cumplimiento por matriz) | 25 |
| Figura 4. Gráficos de control de proceso (A. Datos totales, B. Por metal, C. Por tipo de producto)..... | 27 |
| Figura 5. Análisis de capacidad para el proceso..... | 29 |
| Figura 6. Gráficos de control de proceso sin atípicos (A. Datos totales, B. Por metal). | 32 |
| Figura 7. Análisis de capacidad para el proceso sin valores atípicos. (A. Límites de $\pm 10\%$, B. Límites de $\pm 15\%$)..... | 33 |
| Figura 9. Regresiones lineales para Zinc y Manganeso. | 35 |
| Figura 10. Distribución de los controles instrumentales y de proceso | 38 |
| Figura 11. Distribución de los controles de matriz enriquecida..... | 40 |
| Figura 12. Dispersión de los quintuplicados de los analistas para pruebas de repetibilidad. | 41 |
| Figura 13. Comparación de las pendientes de las curvas de calibración..... | 43 |
| Figura 14. Distribución de muestras analizadas mediante el método validado..... | 44 |
| Figura 15. Distribución del desempeño con respecto al metal para las muestras analizadas. | 45 |
| Figura 16. Comparación del cumplimiento de las muestras analizadas en relación con los límites establecidos por la empresa. (A. Cumplimiento por metal, B. Cumplimiento por matriz)..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Gráficos de control de proceso para las muestras analizadas sin datos atípicos (A. Datos totales, B. Por metal)..... | 47 |
|--|----|

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Diseño experimental de Youden-Steiner para el análisis de metales en premezclas. | 62 |
| Anexo 2. Base de datos utilizada para el análisis retrospectivo correspondiente a años 2018-2019. | 63 |
| Anexo 3. Resumen de datos descriptivos con respecto a desempeño para el conjunto de datos estudiado. | 63 |
| Anexo 4. Resumen de la estadística descriptiva para el conjunto de muestras analizadas. . | 63 |
| Anexo 5. Estadística descriptiva de los controles de masa y lectura. | 64 |
| Anexo 6. Estadística descriptiva de los controles de matriz fortificada..... | 64 |
| Anexo 7. Resultados de las pruebas de repetibilidad. | 65 |
| Anexo 8. Informe correspondiente al análisis retrospectivo presentado a la empresa productora. | 65 |
| Anexo 9. Presentación visual expuesta a la empresa productora. | 65 |
| Anexo 10. Base de datos utilizada para la validación del método analítico, datos para manganeso. | 65 |
| Anexo 11. Base de datos utilizada para la validación del método analítico, datos para zinc. | 65 |
| Anexo 12. Documento resumido de las pruebas estadísticas realizado a la data de manganeso. | 65 |
| Anexo 13. Documento resumido de las pruebas estadísticas realizado a la data de zinc. ... | 65 |
| Anexo 14. Informe de validación del método analítico para la determinación de zinc y manganeso en premezclas alimnetacias animales mediante absorción atomica. | 65 |
| Anexo 15. Base de datos de las muestras analizadas durante 3 meses del año 2021. | 66 |
| Anexo 16. Resumen de las pruebas estadísticas realizadas con las muestras analizadas. ... | 66 |

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y justificación

La actividad pecuaria se refiere al conjunto de actividades dedicadas a la explotación económica de animales, tradicionalmente: bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y aves. Según la oficina regional de la Organización de las Naciones Unidas para alimentación y agricultura, “FAO” por sus siglas en inglés, la actividad pecuaria en América Latina es considerada una estrategia capaz de satisfacer simultáneamente la conservación de los ecosistemas, la conservación de la vida silvestre y el sustento diario de los hogares, por lo que es considerado como una herramienta de desarrollo social, económico y cultural.¹

América Latina aporta alrededor del 23 % de la carne bovina consumida globalmente, un 21.4 % de la carne de ave, un 11.2 % de la leche y un 10 % del consumo global de huevos. El crecimiento del sector pecuario en América Latina ha alcanzado una tasa anual del 3.7 %, valor superior a la tasa promedio de crecimiento registrada a nivel global correspondiente a un 2.1 %. De este modo, el sector pecuario contribuye con un 46 % del producto interno bruto agropecuario de América Latina.¹

Según el informe de desempeño del sector agropecuario de SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería), durante el 2018, el sector primario en Costa Rica fue el segundo agente generador de empleo, dando oficio a 266 271 personas, lo cual representa un 12.3 % de la población ocupada.² En Costa Rica destaca la exportación agrícola, con productos como el banano, la piña y el café; sin embargo, es indubitable el aporte de la producción pecuaria al país. Según el informe del primer trimestre del 2021, el sector agropecuario significó un 41,1 % de todas las exportaciones del país, lo que es un 10 % mayor a lo reportado durante el mismo periodo del año anterior, adicionalmente las exportaciones al mercado estadounidense aumentaron en un 82,7 % llegando a cubrir el 32% de la participación en exportaciones nacionales en esta área.³

En el Cuadro 1, se pueden observar los productos de origen pecuario que significaron un mayor ingreso para el país en los últimos tres años, donde también se evidencia que la carne bovina congelada es el principal producto de exportación de este sector. Ciertamente debido

a la contracción de la economía mundial, iniciada en el 2020, se dio una reducción en las exportaciones; sin embargo, en la actualidad, las mismas están recobrando fuerza por lo que es pertinente asegurar una correcta alimentación de los animales a nivel país.

Cuadro 1. Costa Rica: Valor de los principales productos exportados por el sector pecuario. 2019, 2020, 2021.

| Descripción | Valor 2019 (Miles de dólares) | Valor 2020 (Miles de dólares) | Valor 2021(Miles de dólares) |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Carne bovina, congelada | 90 963 | 50 060 | 53 369 |
| Leche y nata, concentrada | 50 154 | 27 217 | 19 811 |
| Leche y nata, sin concentrar | 44 731 | 24 820 | 18 602 |
| Lactosuero | 20 887 | 10 832 | 7 367 |
| Quesos y requesón | 13 937 | 7 135 | 4 709 |
| Huevos de ave con cáscara | 12 689 | 4 014 | 5 014 |
| Carne bovina, fresca o refrigerada | 11 200 | 7 415 | 7 013 |
| Suero de mantequilla | 10 027 | 3 507 | 4 809 |
| Despojos comestibles de bovinos, porcinos y ovinos | 9 877 | 3 357 | 4 452 |
| Otros | 23 866 | 15 645 | 13 952 |
| Total | 288 331 | 154 002 | 139 099 |

Nota: Adaptado de referencia 2 y 3.

1.1.1 Importancia nutricional

El ganado, tanto ovino como bovino y otras especies pecuarias, requieren suplementación de minerales en la dieta, esto debido a que los piensos sencillos y el suelo (por ende, las plantas) no brindan todos los nutrientes necesarios.⁴ Durante el proceso de producción animal, la dieta incorpora nutrientes orgánicos, componentes energéticos, fibra, proteínas y vitaminas, sin embargo, también es importante garantizar la presencia de las cantidades necesarias de micronutrientes y otros minerales.⁵ Los macrominerales son minerales que deben ser ingeridos en magnitudes relativamente mayores, entre estos: calcio (Ca), fósforo (P), sodio

(Na), cloruro (Cl), potasio (K), magnesio (Mg) y azufre (S). Por su parte, los microminerales, conocidos también como oligoelementos, necesitan ser ingeridos en cantidades menores, mas no pueden ser eliminados totalmente de la dieta, entre estos: hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co), yodo (Y), molibdeno (Mo) y selenio (Se).^{6,7}

En el mercado existen distintas opciones de concentrados comerciales que se encuentran enfocadas en etapas etarias, productivas o por especie animal.⁵ Es importante considerar los minerales que incorpora cada uno de estos concentrados y los valores recomendados de ingesta para cada animal, así como su respectiva etapa de desarrollo. En el caso de un animal en crecimiento o proceso reproductivo, requerirá más nutrientes que uno en su etapa adulta, por lo que es importante que un experto realice una evaluación de los aportes nutricionales que requiere cada población animal.^{5,7} Por lo anterior, el control de calidad para la composición de las premezclas alimenticias es de suma importancia, ya que es necesaria información veraz y confiable sobre el contenido nutricional de estos productos.

1.1.2 Empresa productora de premezclas

En la actualidad, esta empresa de base científica con participación en el mercado nutricional y de salud; ofrece productos y soluciones para afrontar algunos de los retos más importantes del sector productivo, generando valor económico, ambiental y social. Actualmente, sus operaciones se encuentran distribuidas a nivel mundial, en Costa Rica, se orientan a la manufactura de premezclas vitamínicas y de minerales para animales. Para efectos del presente documento se omitirá el nombre de esta por temas de confidencialidad.

Desde el año 2012 y hasta la actualidad, la empresa en cuestión es cliente del Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos (LASEQ). A lo largo de estos años se identificó que existe una oportunidad de mejora y se requiere de un estricto monitoreo de calidad en sus premezclas. Los representantes de la empresa exteriorizaron que enfrentan un problema en cuanto a la magnitud y variabilidad de la concentración de minerales presente en sus productos finales. Se realizó una revisión conjunta, en la cual se evidenció que dos de los minerales prioritarios, debido a la frecuencia de análisis y a la aparición de las variaciones mencionadas, son el zinc y el manganeso. Asimismo, la empresa cuenta con recopilados de datos, útiles para análisis histórico, mientras que la adquisición de nuevos equipos para ellos

no es una opción viable. Otro punto de mejora evidenciado es la ausencia de herramientas de control para la variabilidad del proceso productivo. Por lo expuesto anteriormente, se plantea realizar un proyecto que incluya el establecimiento de un método de análisis validado y la implementación de un control estadístico adecuado que permita la obtención de productos con la concentración esperada, asegurando la estandarización del proceso productivo de las premezclas.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Descripción de la premezcla

Coloquialmente, los términos concentrado y premezcla son utilizados indiferentemente, sin embargo, es importante trazar una línea clara entre estos términos. Según el reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento Europeo y del consejo del 22 de septiembre del 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal, un núcleo o premezcla refiere a todo producto que se adiciona a una mezcla final y contiene sustancias ausentes o por debajo del nivel óptimo en los alimentos animales.⁸ Por su parte, un concentrado es una mezcla de ingredientes donde sustratos energéticos o proteicos se encuentran en alta proporción, este será adicionado a las materias primas alimenticias para generar un pienso compuesto. De lo anterior se establece que a partir de la premezcla se produce el concentrado, posteriormente la mezcla del concentrado y algunos cereales (por ejemplo, tortas oleaginosas y plantas) generan el producto para consumo del animal, conocido como pienso.⁹

Las premezclas se diseñan con cualidades y funciones específicas, por lo que se pueden encontrar combinaciones de vitaminas, minerales, micro y macronutrientes necesarios para cada etapa productiva del animal. En el diseño de estos productos se incorporan importantes detalles biológicos de los animales como lo es el tránsito intestinal, el microbiota intestinal y el sistema inmune, entre otros; con el fin de obtener un máximo aprovechamiento de los nutrientes, lo cual se refleja en un animal con salud óptima.¹⁰ En el mercado general no suelen encontrarse las premezclas sino los concentrados con nombres como “starter”, “broiler”, “ponedora” y “lactación”.^{6,7}

En el Cuadro 2 se resumen las dosis recomendadas y funciones en las que participan los principales minerales.¹¹

Cuadro 2. Descripción general de las funciones de los minerales traza, requerimientos y nivel máximo tolerable

| Minerales | Función | Requerimientos “Nutrición mineral del ganado” (NRC) (mg/kg de masa seca (MS)) | Nivel Máximo Tolerable Consejo de investigación agrícola (ARC) (mg/kg de MS) |
|------------------|--|--|---|
| Zn | Síntesis proteica | 20-33 | 50 |
| Fe | Movimiento de oxígeno en el cuerpo | 30-50 | 500 |
| Se | Relación con vitaminas, activación y parte de enzimas y hormonas | 0.1-0.2 | 2 |
| Mn | Necesario para el desarrollo normal de los huesos y tendones | 20-40 | 1000 |

Nota: Modificado de la referencia 7,11 y 12

1.2.2 Zinc (Zn) y manganeso (Mn)

El zinc y el manganeso son denominados elementos traza esenciales ya que forman parte de las metaloenzimas, enzimas que requieren de un metal específico para su función.⁷ Estas generalmente se relacionan con la formación de cartílago, la coagulación sanguínea y el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y lípidos. Adicionalmente, desempeñan un papel fundamental en la absorción intestinal durante etapas donde existe alteración del metabolismo animal, como la gestación.^{13,14} Estudios realizados con novillos sugieren que el zinc cuenta con acción lipogénica, es decir, permite la síntesis de ácidos grasos de cadena larga.^{15,16} Además del efecto lipogénico, se ha estudiado el efecto del zinc sobre los adipocitos, donde se observó que el zinc puede afectar la potencia biológica de la insulina, básicamente potenciándola.^{17,18} El zinc participa en la estimulación de la renovación del tejido cutáneo¹⁹, también se ha encontrado que tiene un efecto antitumoral, ya que los

niveles de este metal encontrado en el tejido tumoral son distintos a los usuales.^{20,21} Estudios han demostrado que el zinc induce la absorción intestinal de hierro, así como el transporte transcelular, mediante la expresión inducida de los dos transportadores de hierro: transportador de metal divalente 1 (DMT1) y la ferroportina 1 (FPN1).^{22,23} Se ha determinado que el zinc participa de varios procesos de señalización intracelular.

El manganeso es importante para la fertilidad y el desempeño del sistema nervioso central, forma parte de los componentes de los procesos enzimáticos como: fosfatasas óseas, fosfatasas sanguíneas, carboxilasas, arginasas, fosfato transferasas y descarboxilasas. Es indispensable para el desarrollo normal de los huesos y tendones.²⁴ En general se ha determinado que el manganeso participa activamente en el proceso de crecimiento, por lo cual se recomienda un consumo adecuado para mantener los animales saludables y evitar enfermedades.²⁵

El zinc y el manganeso son micronutrientes esenciales para el crecimiento y la buena salud, por lo que su deficiencia genera síntomas clínicos como atrofia del crecimiento y baja en los niveles funcionales de plasma sanguíneo. Lamentablemente, no existe un biomarcador establecido para el zinc, como la hemoglobina para la deficiencia de hierro (i.e., anemia), por lo que es más complejo detectar su deficiencia de manera preventiva.²⁶ Sin embargo, es interesante que los individuos con deficiencia de hierro presentan enfermedades genéticas muy específicas de la deficiencia de zinc como lo es la *acrodermatitis enteropathica*.²⁷ La deficiencia de manganeso provoca desarrollo óseo anormal, piernas arqueadas o deformes, anomalías en fertilidad, ausencia del celo y abortos. En aves provoca preosis, cabeza retraída, huevos con cáscara frágil, engrosamiento de articulaciones, crecimiento lento y pérdida del sentido.²⁸

En estudios animales donde se ha realizado una modificación dietaria, se ha encontrado una relación entre la anemia, la acumulación de hierro en los tejidos y la deficiencia de zinc. Estudios donde se les sometió a animales a dietas bajas en zinc y evidenció una reacción en parámetros relacionados al hierro como la hemoglobina y el conteo de glóbulos rojos (lo que usualmente se explica por eritropoyesis, que es la reducción en la producción de glóbulos rojos o por catabolismo aumentado).²⁹ Otro estudio en el cual utilizan condiciones dietarias similares a las descritas anteriormente, generó acumulación de hierro en múltiples tejidos,

síntoma que fue fácilmente revertido utilizando suplementación dietaria con zinc.³⁰ La deficiencia de zinc genera calcificación, inflamación y cambios escleróticos en el tejido renal, ya que no solamente promueve la absorción del hierro, sino también de otros metales como calcio, fósforo, aluminio y cobre.^{31,32} Finalmente, se registra una relación de la deficiencia de zinc con el desarrollo de úlceras y heridas cutáneas. Por lo tanto, un nivel adecuado de zinc disminuye la exposición a daños vasculares.³³

Según el Agricultural Research Council de los Estados Unidos de América (ARC) con al menos 7 mg/kg de Zinc (MS) en la dieta, no se presentan signos de deficiencia, no obstante, para mantener el nivel de zinc recomendado en sangre (0.9 a 1.5 mg/l), la cantidad mínima recomendada es de 14 mg/kg.¹² El requerimiento de zinc puede variar dependiendo de la etapa del animal, en los carneros es indispensable garantizar una dosis apta que permita el adecuado crecimiento testicular y la espermatogénesis, mientras que para el crecimiento corporal el requerimiento de este mineral es menor.¹³ Las cantidades mínimas sugeridas para ovinos en crecimiento son de 20 mg/kg Zn para machos y 33 mg/kg de Zn para hembras gestantes o lactantes.^{12,13} Además factores como el exceso de Ca, Cd, Fe, Mn, Mo y Se, así como las infecciones bacterianas o virales, pueden incrementar los requerimientos de zinc.¹² En el caso del manganeso, no existe una dosis mínima recomendada, no obstante, se ha demostrado que el requerimiento para el crecimiento del animal es menor que la necesaria para la reproducción. Las dietas que contienen 10 mg /kg de Mn son adecuadas para el crecimiento y se considera que una dosis 20 mg/kg debe ser suficiente para estados reproductivos.^{7,13}

1.2.3 Metodologías para el análisis de minerales en alimentos

El análisis de minerales a niveles traza en matrices de alimentos requiere de un proceso de digestión que permite asegurar que los analitos se encuentran en disolución y libres de componentes de la matriz, de manera que los iones metálicos en la muestra queden disponibles para su análisis.³⁴ Para lo anterior, se utilizan medios ácidos y calentamiento, no obstante, dependiendo de la matriz y la técnica de análisis empleada, existen distintos

métodos para poder ser utilizados, como la extracción con disolventes³⁵, la digestión húmeda³⁶, la digestión seca y la digestión asistida por microondas.

Esta última técnica, empleando ácido nítrico concentrado, ha sido ampliamente utilizada para el procesamiento de muestras alimenticias.³⁷⁻⁴⁰ Esta metodología permite la determinación de elementos como plomo, cadmio, cromo, níquel, zinc, hierro, manganeso, cobre, cobalto, entre otros. También se ha demostrado su utilidad en múltiples matrices como hongos comestibles⁴¹, alimentos enlatados⁴², grasas hidrogenadas y chocolates⁴³, lo cual prueba la versatilidad de la técnica y sugiere que es útil para diversas matrices.

Mediante la digestión microondas, se ha comprobado que es posible utilizar el ácido nítrico diluido sin reducir la capacidad oxidante de esta sustancia⁴⁴, lo que brinda beneficios económicos y ambientales al emplear esta técnica.⁴⁵ La alta eficiencia de descomposición de la muestra mediante ácido nítrico se debe a las reacciones de regeneración que ocurren dentro de los tubos de microondas y la formación de un gradiente entre la fase líquida y gaseosa durante la digestión de las muestras.⁴⁶ Cabe mencionar que en muchos casos se utiliza peróxido de hidrógeno y ácidos inorgánicos (e.g., perclórico, clorhídrico o sulfúrico) como coadyuvante para la digestión, ya que este genera oxígeno *in situ*, esencial para la oxidación, lo que a su vez propicia una mayor eficiencia en la digestión.^{47,48}

Las técnicas más comunes para el análisis de minerales en alimentos son el Plasma de Acoplamiento Inductivo con un espectrómetro de masas como detector (ICP-MS), Acoplamiento Inductivo con detector Espectrofotométrico de Emisión (ICP-OES) y la Espectroscopia de Absorción Atómica (AA). La técnica de ICP es una tecnología derivada del AA, posee una alta sensibilidad y rapidez en el análisis multi-elemental que permite el análisis de casi todos los elementos de la tabla periódica.^{49,50} Entre sus principales fortalezas, ofrece la eliminación de las interferencias presentes en la matriz y una alta relación señal-ruido. La técnica se fundamenta en excitar iones mediante plasma y realizar la cuantificación con respecto a las cuentas/s de una relación masa/carga de un isótopo de referencia.⁴⁹

La técnica de absorción atómica ha sido utilizada desde los inicios del siglo XIX. La primera aplicación se registra en la determinación de mercurio, pero es hasta 1995 cuando Walsh descubrió la utilidad de la técnica para el análisis elemental.⁵¹ El principio analítico de la técnica se basa en que los electrones de los átomos pueden ser promovidos a orbitales de

mayor energía mediante la absorción de cantidades discretas de energía a longitudes de onda específicas y características. Otro factor que sustenta la técnica es la ley de Beer-Lambert, que relaciona la absorción de luz por un material con la concentración de especies capaces de absorber dicha radiación en este.^{52,53} Esta técnica es extremadamente sensible y específica, ya que las líneas de absorción atómica son estrechas (0.002 a 0.005 nm) y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento.⁵⁴

En la técnica de absorción atómica por llama, la muestra líquida es nebulizada utilizando un gas oxidante mezclado con un gas combustible para ser atomizada en el quemador. La lámpara, generalmente fabricada a partir del metal a analizar, emite las longitudes de energía características del elemento, la cual pasa por la llama donde los electrones de los átomos absorben una cantidad de energía, cuantificable mediante la diferencia de la intensidad de energía emitida por la lámpara y la recibida por el detector, que es proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. Finalmente, debido a la estrechez de las líneas de absorción mencionadas, es poco usual que la longitud de onda de dos metales se traslape.^{54,55,56}

1.2.4 Definiciones

A continuación, se detallan algunas definiciones de interés para propiciar un mejor entendimiento proyecto:

- Validación: Proceso que utiliza estudios de laboratorio para establecer si el desempeño de un método cumple con los requisitos previstos⁵⁷, le brinda confiabilidad a la técnica analítica⁵⁸ y puede ser tan exhaustivo o simplificado como sea necesario.⁵⁹
- Selectividad: Grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.^{60,61,62}
- Veracidad: Expresión de la proximidad de la media a un valor de referencia. Usualmente se puede realizar una evaluación práctica de la veracidad.^{60,61}
- Límite de detección (LD): Mínima concentración de analito que puede ser detectada por el método.^{60,62}

- Límite de cuantificación (LC): Mínimo nivel en el que el analito se puede determinar con un nivel aceptable de precisión y veracidad. ^{60,62}
- Robustez: Medida de la capacidad de un método analítico para permanecer sin afectaciones por pequeñas variaciones premeditadas de algunos parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal. ⁶⁰
- Carga: Para efectos del proyecto refiere a la cantidad de kilogramos correspondientes a la producción total del lote.
- Metal: Refiere al analito específico estudiado, en el presente documento entiéndase como manganeso (Mn) o zinc (Zn).
- Desviación estándar (DE): Medida que permite evaluar la variación o dispersión de un conjunto de datos, aritméticamente refiere a la raíz cuadrada de la varianza. ⁶³
- Desempeño: Para el presente documento entiéndase como la relación porcentual entre el valor obtenido de manera experimental y el valor objetivo o esperado para las muestras.
- Cumplimiento: estado en el cual el valor se encuentra dentro de los límites especificados, entiéndase para este documento entre 90% y 110%.
- Gráfico de control: también conocido como diagrama de Shewhart, es una herramienta de monitoreo de proceso que permite el análisis y solución de problemas. Muestra los datos obtenidos en un proceso de manera cronológica junto con los límites establecidos. ⁶⁴
- Sigma: término que proviene de la letra griega σ , usualmente utilizada para denominar la desviación estándar, en calidad se utiliza para referirse a la variabilidad de proceso. El término se utiliza para establecer la amplitud de los límites de control y relacionar el proceso con su eficiencia según lo dado por una campana de probabilidad de Gauss. En la mayoría de los casos, puede utilizarse como sinónimo de “desviaciones estándar”. ⁶⁵
- Límite de Control: líneas horizontales ubicadas por encima y por debajo de la línea de tendencia central en un gráfico de control, reflejan la variación aleatoria del proceso y son el umbral que permite determinar si el proceso se encuentra bajo

control, se utiliza como criterio común que se ubiquen a tres sigmas de la línea central.⁶⁴

- Límite de Alerta: paralelos a los límites de control, brindan una primer alerta que permite tomar medidas antes de que el proceso se salga de control estadístico, comúnmente se ubican a dos sigmas de la línea de tendencia central.⁶⁴
- Cedasticidad: refiere a una propiedad de las regresiones lineales relacionada a los errores en la estimación, los cuales pueden ser constantes (homocedasticidad) y brindan fiabilidad a las estimaciones realizadas con la regresión lineal o no constantes (heterocedasticidad) lo que es una propiedad indeseable.⁶³
- Control Instrumental: conocido también como control de lectura, se trata de una dilución de concentración conocida preparada a partir de un material de referencia certificado (MRC) utilizada cristalería calibrada. Permite verificar que la señal respuesta del instrumento, en este caso el espectrofotómetro de absorción atómica es la esperada.
- Control de Proceso: control de concentración conocida preparado a partir de sales del metal de interés, se le da el mismo tratamiento que a una muestra, desde su pesaje, pasando por la digestión, hasta su respectiva lectura, permite verificar la recuperación del proceso analítico al cual se somete la muestra, también conocido como control masa.
- Control de Matriz Enriquecida: control preparado mediante el método de adiciones estándar, se preparan muestras convencionales de manera pareada a muestras enriquecidas para evaluar un posible efecto matriz de los formulados alimenticios.
- Coeficiente de variación (% CV): medida estadística que muestra la dispersión de un conjunto de datos de manera relativa, ya que se expresa como la relación entre la desviación típica y la media multiplicado por cien para expresarse como porcentaje.⁶³

1.2.5 Validación de métodos

A nivel mundial, se realizan miles de mediciones y pruebas de laboratorio, los cuales tienen como finalidad valorar la calidad de artículos comerciales, análisis sanitarios, control de calidad de la potabilidad del agua, alimentos, piensos, análisis forenses, entre otros. Generalmente los resultados analíticos son utilizados para la toma de decisiones, lo cual

posee implicaciones importantes en distintos niveles. Por ejemplo, los análisis de calidad se utilizan para la liberación de lotes de alimentos, el cumplimiento de leyes ambientales o la determinación de la inocencia de una persona en un análisis forense. Por lo anterior, la importancia de realizar mediciones confiables que permitan tener la seguridad que el resultado es veraz y que han sido obtenidos mediante la aplicación de métodos y materiales trazables.⁵⁷

Los métodos analíticos pueden ser sometidos a un proceso de validación exhaustivo o simplemente a la verificación de algunos parámetros de desempeño. Según Eurachem y el apartado 5.4.4.2 de la norma ISO/IEC 17025:2017, un método amerita una validación cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto.⁵⁸ Por lo anterior, es recomendado diseñar un plan de validación en cualquier escenario donde se incluyan métodos no normalizados, diseñados o desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación, ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados o la necesidad de demostrar la equivalencia de dos métodos.

En adición a la naturaleza del método, un factor que determina la rigurosidad de validación corresponde al ajuste del propósito del laboratorio. Por su parte, una verificación es propia de métodos normalizados, es decir métodos desarrollados por un organismo de normalización u otro organismo de reconocimiento internacional que cuente con el apoyo técnico correspondiente, como el caso de ISO o ASTM.⁵⁹ En este caso es necesario verificar el desempeño según lo detallado en la ISO/IEC 17025 apartado 5.4.2.^{57,58}

El alcance de la validación debe ser establecido según el propósito y la situación del laboratorio. Según la guía para validación de métodos del Ente Costarricense de Acreditación (ECA-MC-PO01-G01) existen tres posibles situaciones para un método: normalizado, normalizado modificado y no normalizado. En la primera situación, la validación debe enfocarse en verificar parámetros como precisión, veracidad, incertidumbre, límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.), ámbito de trabajo, entre otros. En la segunda situación, los parámetros a verificar dependen completamente de las modificaciones realizadas al método, tal y como se aclara en el cuadro 3. En la tercera situación, al tratarse

del caso más atípico y con mayor cantidad de parámetros a verificar, se recomienda consultar el cuadro 3 del ECA-MC-PO01-G01.⁶⁶

Cuadro 3. Parámetros de desempeño mínimos a revalidar cuando se da una modificación a un método normalizado.

| Modificación | Parámetros de desempeño mínimos a revalidar | | | | | | | | | | |
|--|---|-----------|--------------|-----------|------|------|------------|----------|---------------|-------------------|---------------|
| | Selectividad | Veracidad | Recuperación | Precisión | L.D. | L.C. | Linealidad | Robustez | Repetibilidad | Ámbito de trabajo | Incertidumbre |
| Método de extracción | X | X | X | | | | | | | | |
| Matriz de la muestra | X | X | | X | X | X | | | | | |
| Extensión del ámbito | | | | X | | | X | | | | |
| Cambios en condiciones experimentales | | | | | | | | X | | | |
| Cambio de operador, analista o metrólogo | | X | | X | | | | | X | | |
| Sistema de detección | X | | | | | | X | | | X | |
| Cambio de patrones, equipos o reactivos | X | X | | X | X | X | | | | X | X |

Nota: Modificado de las referencias 66 y 67

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Evaluar la concentración de zinc y manganeso en la producción de premezclas alimenticias animales, mediante el estudio de la composición en la manufactura para la estandarización del proceso productivo.

2.2 Objetivos específicos y actividades

| Objetivo | Actividades |
|---|--|
| Estudiar la concentración de zinc y manganeso en las premezclas alimenticias mediante un análisis retrospectivo de datos como insumo para la aplicación de medidas que permitan a la empresa la estandarización del proceso. | <ul style="list-style-type: none">• Tratamiento estadístico retrospectivo de los datos colectados en los últimos dos años.• Análisis de las correlaciones de los factores de producción y la concentración en el producto terminado.• Aplicación de herramientas de calidad para determinar el comportamiento del proceso productivo.• Elaboración de un informe y capacitación a la empresa productora. |
| Validar un método de análisis para la determinación de zinc y manganeso mediante la técnica de absorción atómica en llama, con digestión por microondas, en una matriz de premezclas alimenticias para ganado bovino y crianza avícola. | <ul style="list-style-type: none">• Establecimiento de los parámetros de desempeño y criterios de aceptación para el método analítico a utilizar.• Ejecución del plan de validación propuesto mediante el análisis de muestras de la matriz a validar.• Análisis de los resultados mediante la comprobación del cumplimiento de los criterios de aceptación propuestos.• Elaboración del informe de validación. |

| | |
|--|--|
| <p>Analizar la concentración de zinc y manganeso en premezclas alimenticias utilizando el método validado para la determinación de la eficacia de las medias implementadas por la empresa.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Toma de muestras en diversos lotes, de producto terminado. • Análisis de las muestras mediante el método validado. • Evaluación estadística de los resultados obtenidos. • Comparación del contenido de zinc y manganeso en el proceso producción • Determinación del cumplimiento de las especificaciones de calidad en el producto final con relación a las concentraciones de zinc y manganeso. • Generación de un informe que compile los resultados obtenidos y recomendaciones que permitan a la empresa optimizar el proceso productivo. |
|--|--|

2.3 Hipótesis

Se puede implementar un control de calidad estadístico para la producción de las premezclas, analizando las relaciones existentes entre los factores de producción, mediante el análisis de datos históricos de la concentración de zinc y manganeso, cuya eficiencia será evaluada a través del estudio de la composición de estos minerales en diferentes lotes, utilizando para esto un método analítico previamente validado.

III. METODOLOGÍA

3.1 Análisis de zinc y manganeso

Para la evaluación de la concentración de manganeso y zinc en las premezclas se utilizaron los métodos 968.08 (Minerales en piensos y alimentos para mascotas) y el método 999.10 (plomo, cadmio, zinc, cobre y hierro en alimentos mediante espectrofotometría de absorción

atómica luego de digestión por microondas). Ambos métodos pertenecen al Official Methods of Analysis (OMA) de la Asociación Oficial de Químicos Agrónomos (AOAC) ⁶¹ y fueron adaptados para la adecuación del propósito en el LASEQ, por lo que se hizo necesario realizar un proceso de validación de ensayos.

3.2 Validación del método de análisis

Según lo expuesto en el Cuadro 4, la guía para la aplicación de la política de validación de métodos de ensayo del Ente Costarricense de Acreditación (ECA-MC-PO01-G01)^{66,67} y la Guía de Adecuación para el Propósito de los Métodos de Ensayo de la EURACHEM,⁶⁰ con el objetivo de realizar un proceso de validación adecuado y confiable, se procederá a realizar la validación de los siguientes parámetros de desempeño.

Cuadro 5. Parámetros de desempeño, modo de evaluación y criterios de aceptación para la validación del método de análisis de zinc y manganeso en premezclas alimenticias bovinas y avícolas.

| Parámetro de desempeño | Método de evaluación | Criterio de aceptación |
|------------------------|---|---|
| Robustez | Se aplicó el diseño experimental de Youden-Steiner (ver sección 3.3). | La robustez se utilizó como parámetro de comparación previo entre el método normalizado y el modificado. Se pretende identificar los factores sensibles a cambios en el método y tomar las medidas necesarias para su control. |
| Linealidad | Se preparó un modelo de regresión lineal utilizando al menos 18 puntos de calibración, considerando entre 4 y 6 niveles de concentración. | Coefficientes de correlación de Pearson mayores o iguales a 0,995. Los modelos de regresión deben cumplir con los supuestos estadísticos básicos para un modelo de regresión lineal (normalidad de residuales, homocedasticidad, sumatoria de residuales próxima a cero) ⁶⁸ |

| | | |
|--|---|---|
| <p>Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)</p> | <p>Se calcularon los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) a partir de la estadística del modelo de regresión lineal utilizando el método Miller & Miller ⁶⁹</p> | <p>LD y LC deben ser menores al primer punto de calibración del modelo de regresión lineal</p> |
| <p>Recuperación, veracidad y especificidad</p> | <p>Se prepararon muestras reales fortificadas con el analito, evaluando la recuperación en distintos lotes de producción</p> <p>Debido a la complejidad de la matriz, hasta el momento no existe disponibilidad de materiales de referencia certificados (MRC). Considerando que la veracidad debe ser evaluada mediante el sesgo, se propone evaluar la veracidad mediante el parámetro de recuperación.</p> <p>La especificidad se evaluó a partir de adiciones conocidas, utilizando el Método compendial 1225 USP 31, en el cual se evaluará en conjunto con la recuperación.</p> | <p>Los valores de recuperación deben de oscilar entre 90 y 107%.⁶⁷</p> |
| <p>Precisión (precisión intermedia y repetibilidad)</p> | <p>Se analizó por septuplicado la misma muestra, el mismo día, con el mismo equipo por al menos dos analistas distintos.</p> <p>Se calculará la desviación estándar para cada analista.</p> | <p>Debe existir homogeneidad de varianzas para los resultados obtenidos por distintos analistas.</p> <p>Debe existir homogeneidad de varianza para los resultados obtenidos por un mismo analista para la misma muestra en diferentes días.</p> |

Se calculará la desviación estándar
relativa de cada analista (RDE)

El coeficiente de variación no debe
superar el 8%.⁶⁷

Efecto matriz

Se prepararon curvas de calibración con adición estándar del analito a evaluar sobre la matriz a validar, realizando todas las etapas del procedimiento analítico.

No existe diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de las curvas de calibración preparadas con y sin matriz.

Se compararon las pendientes de la curva con adición estándar y la curva utilizada para evaluar linealidad.

3.3 Diseño experimental de Youden-Steiner

El diseño clásico de Youden-Steiner permite evaluar la robustez de un método considerando siete variables en dos niveles: mayúsculas (método normalizado) y minúscula (pequeñas variaciones) con ocho análisis de una muestra.⁷⁰ adicionalmente los resultados de cada análisis se etiquetaron con letras de la s a la z, generando el diseño experimental de la prueba como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Diseño experimental de Youden-Steiner.

| Variables | Ensayo | | | | | | | |
|-----------|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A,a | A | A | A | A | a | a | a | a |
| B,b | B | B | B | b | B | b | b | b |
| C,c | C | c | C | c | C | c | C | c |
| D,d | D | D | d | d | d | d | D | D |

| | | | | | | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| E,e | E | e | E | e | e | E | e | E |
| F,f | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G,g | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Resultados | s | t | u | v | w | x | y | z |

Para el análisis de datos, los resultados obtenidos deben agruparse de la siguiente manera:

$$\text{Valores altos}(A) = \frac{s + t + u + v}{4} = \frac{4A}{4}$$

$$\text{Valores bajos}(a) = \frac{w + x + y + z}{4} = \frac{4a}{4}$$

Finalmente, se calcula la diferencia entre los valores altos y los valores bajos y se comparan con la raíz cuadrada de dos multiplicada por la desviación estándar de las diferencias. Si el valor de la diferencia es mayor, el método es sensible a dicha variable.⁷⁰

$$(XA - Xa) > \sqrt{2} * Sdi$$

En el Cuadro 8 de los anexos se puede observar la propuesta de diseño experimental para la evaluación de la robustez del método.

3.4 Muestreo

Los planes de muestreo se establecieron a partir del tamaño de los lotes producidos. En este caso, el tamaño de los lotes era variable y dependía de la solicitud del cliente ya que se trataba de formulaciones específicas. La capacidad máxima de la planta es de 1400 kg y la mínima 500 kg por lote, mientras que las bolsas de producto terminado son de 25 kg. Por lo anterior, los lotes se encuentran en el intervalo de 20-56 bolsas. Tomando en consideración las directrices generales sobre muestreo (CAC /GL50-2004) del CODEX alimenticio,^{71,72} se estableció el muestreo más estricto sugerido, es decir, el del tamaño de lote mayor, en este caso, dicho documento recomienda el muestreo de 5 unidades por lote. Haciendo uso de la metodología validada, se realizaron análisis a 13 lotes de producto terminado producidos entre febrero y abril del año 2021, analizando tanto zinc como manganeso para un total de 130 muestras analizadas. Este número de muestras se definió con base a la proyección de producción que manejaba la empresa para los meses de febrero y marzo, la cual era de 500

unidades. Se hizo uso de dicha aproximación, tomando en cuenta que la tolerancia de calidad establecida por la empresa y utilizada en este proyecto es de un 10% y procurando mantener un nivel de confianza del 99 %.

Se llegó a la conclusión de que el tamaño de muestra ideal es de 126 unidades, número que finalmente se redondeó hacia la decena superior con el fin de brindar aún más robustez a los datos recolectados. Cabe resaltar que se mantuvo este número de muestras alto como parte del compromiso al control de la calidad inherente al proyecto, ya que, si se reduce el nivel de confianza a un 95%, (valor comúnmente utilizado y confiable para la mayoría de las ocasiones) el tamaño de muestra se reduce hasta 81 unidades.⁷³

3.5 Análisis de datos

Se realizó un análisis estadístico de los datos aportados por el sistema de calidad de la empresa, lo cuales corresponden a muestras de producto terminado equivalentes al 3% de los lotes producidos para ventas en Costa Rica, las muestras comprenden el periodo 2018-2019.

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio de datos para determinar la normalidad y otros estadísticos descriptivos para el desempeño del proceso, entendiéndose esta variable como la relación porcentual de la concentración obtenida y la concentración formulada para un lote de producto, el análisis fue realizado para el conjunto total de los datos suministrados, así como diferenciados de acuerdo con el tipo de metal y matriz de producto.

Para complementar la interpretación de los datos generados, se aplicaron pruebas de estadística inferencial no paramétrica análogos al análisis de varianza, con el objetivo de determinar si existe diferencia entre el desempeño a causa de algunos factores del proceso (metal, matriz, tamaño del lote); además se realizaron análisis de regresión lineal para determinar el grado de asociación entre la variable desempeño y el tamaño del lote de producción.

Finalmente, se aplicaron herramientas de control estadístico de proceso (gráficos de control y determinación de capacidad de proceso) como insumo para el análisis del control de calidad.

3.6 Control estadístico de proceso

El control estadístico de proceso (CEP) refiere a la aplicación de técnicas estadísticas para determinar si un proceso productivo concuerda con los parámetros establecidos para el producto y a la vez monitorear el desempeño de este. Una de las principales herramientas utilizadas para el CEP son los gráficos de control, ya que brindan mucha información de manera resumida y permiten detectar productos defectuosos, o inclusive notar la incidencia de una modificación en el proceso que conllevara una desviación del valor ideal del producto. El CEP es muy útil para cimentar la toma de decisiones sobre el proceso y comunicar las medidas a la gerencia, ya que no se basa en un criterio arbitrario, sino que se basa en estadística y en estudio de procesos.⁷⁴

3.7 Informe a la empresa

Se brindó un informe a la empresa donde se resumen los resultados obtenidos durante el proyecto, el cual incluye: el informe de la validación realizada, el análisis del comportamiento de los lotes, insumos para el control de calidad, límites de desempeño de proceso y gráficos de variación. Finalmente, se incluyó un análisis de porcentaje de cumplimiento y de aceptación de los criterios internos de calidad para las premezclas una vez implementadas las sugerencias y herramientas de calidad.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis retrospectivo

Al tratarse de datos recolectados de manera anterior al proyecto, a la totalidad de esta sección se le referirá como “análisis retrospectivo”, se evaluó la normalidad del conjunto de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, encontrando que los datos de desempeño total, así como todos los subgrupos analizados (a excepción de los de la categoría “otras especies”) presentan una distribución no normal ($p < 0.05$). Con lo anterior se identificó que los datos no satisfacen las condiciones del Teorema del Límite Central, sugiriendo la posibilidad de un sesgo importante en el desempeño del proceso.⁷⁵

Se analizaron 109 muestras, enfocándose en los parámetros de cantidad de carga y desempeño del proceso. Los lotes suelen ser producidos en cargas específicas, como lo son 500 kg, 1000 kg y 1400 kg. Por esta razón se tomó la decisión de seccionar los datos de tamaño del lote en dos grupos, carga baja para los menores a 1000 kg y carga alta para los superiores o iguales a dicho valor.

A través de una prueba de permutación se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa ($F = 1.83$, $p > 0.05$) entre el desempeño y el tamaño del lote. Adicional a esto se generó un modelo de regresión lineal para determinar la correlación entre el desempeño y cantidad de carga de los lotes, no obstante, los resultados indicaron que no existe correlación significativa entre estas variables ($p > 0.05$ $r^2_{\text{adj}} = -0.0008038$). Finalmente se probó la hipótesis de que exista relación entre la cantidad de carga y el cumplimiento, esto mediante una permutación, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($F = 1.01$, $p > 0.05$).

Por su parte, para el desempeño, se obtiene una media de 103.8 %, con una desviación estándar de 20.7. Esto muestra indicios positivos ya que el valor promedio de desempeño para el proceso se encuentra bastante cerca del valor objetivo, que debe ser 100%.

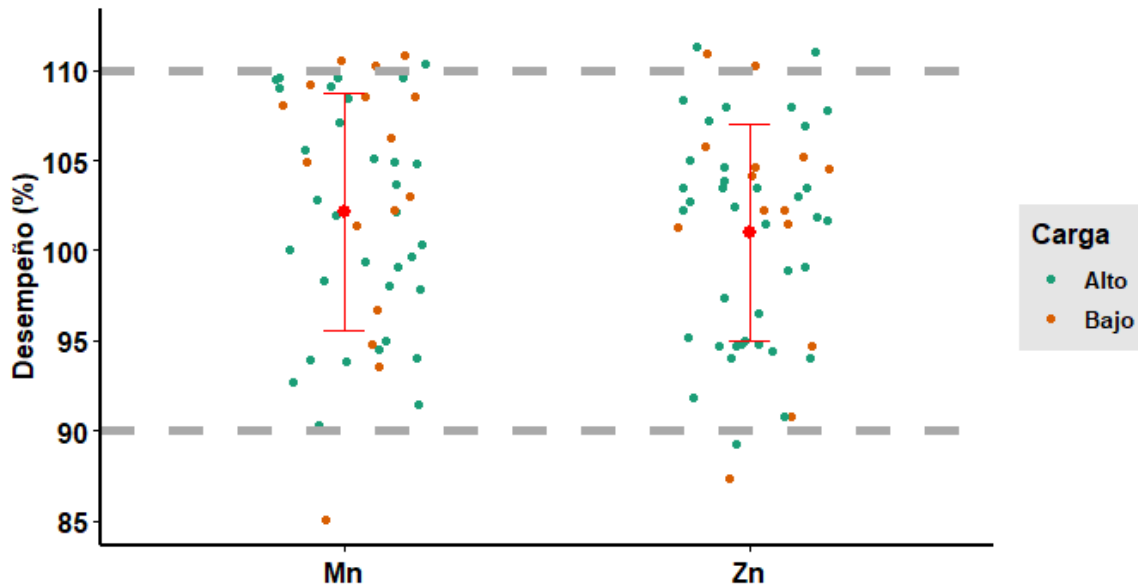


Figura 1. Distribución de los datos de desempeño con respecto a los factores metal y carga. En la figura 1, se observa el comportamiento de los datos por cada metal analizado y cantidad de carga; se encontró un comportamiento similar al conjunto total de datos. En cuanto a desempeño, la media y desviación estándar para cada metal, siendo 101.7 % (DE=15.6) para manganeso y 105.0 % (DE=23.3) para zinc. La media y desviación del manganeso se encuentran centrados alrededor de los valores establecidos por la compañía (100 ± 10 %), sin embargo, en el caso de zinc la variación es mayor y por ende se puede sugerir que más valores de este metal excederán el límite de control antes mencionado. Con la finalidad de comprobar si esta diferencia se pueda deber a la interacción entre el metal y el desempeño se probó mediante una permutación y no se encontró relación estadísticamente significativa ($F= 0.69$, $p > 0.05$) entre estas variables.

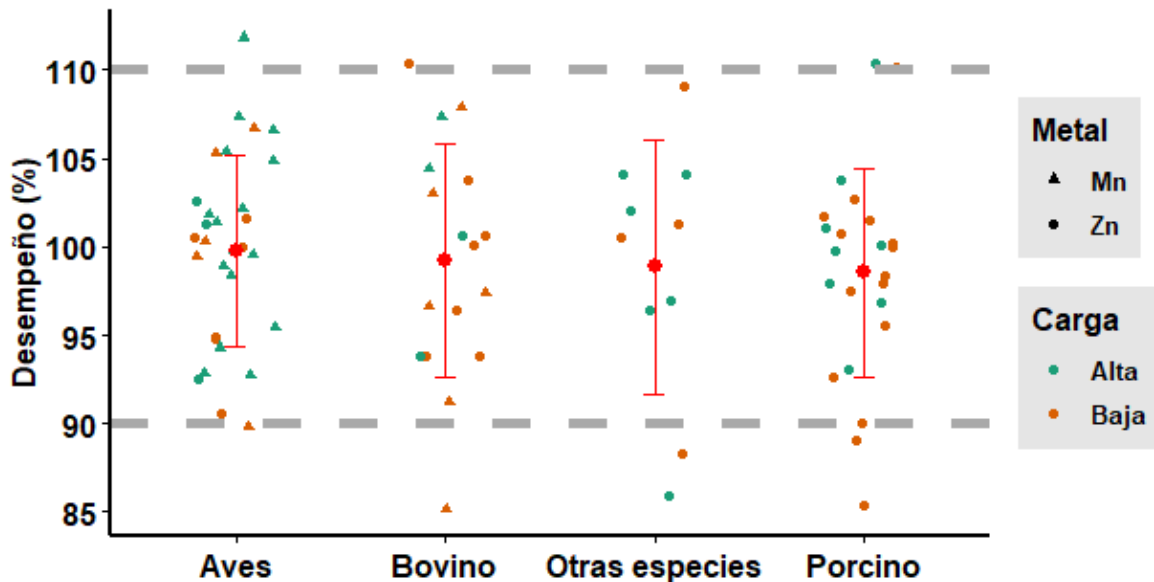


Figura 2. Dispersión de la variable desempeño con respecto al factor categoría.

Con el objetivo de analizar la influencia de otros factores de producción sobre el desempeño, se procedió a realizar el análisis de los datos de acuerdo con las diferentes categorías (matrices) de alimento que produce la empresa, agrupando cuatro grandes categorías: Aves, Bovino, Porcino y Otras especies; donde “otras especies” engloba los productos para peces, perros, gatos, equinos y otros. La media para Aves y Porcinos se encuentran cerca del 100 % de desempeño, con medias de 101.2 % y 103.1 % , respectivamente, y desviaciones estándar de 15.8 y 18.6. Sin embargo, la media y desviación del desempeño de la categoría Bovino es más alta con 111.8 % y 30.9 de desviación, sugiriendo que esta matriz cuenta con más variabilidad, siendo un hallazgo de interés para realizar un posterior análisis exhaustivo de las posibles causas de este fenómeno, ya que podría indicar una sobredosificación en la formulación, lo cual es una potencial fuente de pérdida económica para la compañía. La prueba inferencial indica que no existe diferencia estadísticamente significativa ($F= 1.83, p > 0.05$) para la media del desempeño de acuerdo con cada tipo de producto.

Del análisis anterior, se infiere que actualmente existe una cantidad importante de muestras que no presentan cumplimiento de acuerdo con la variación del proceso máxima establecida

por la empresa, en la figura 3, se muestra el resumen de los datos para el cumplimiento de acuerdo con el metal y la matriz de producto.

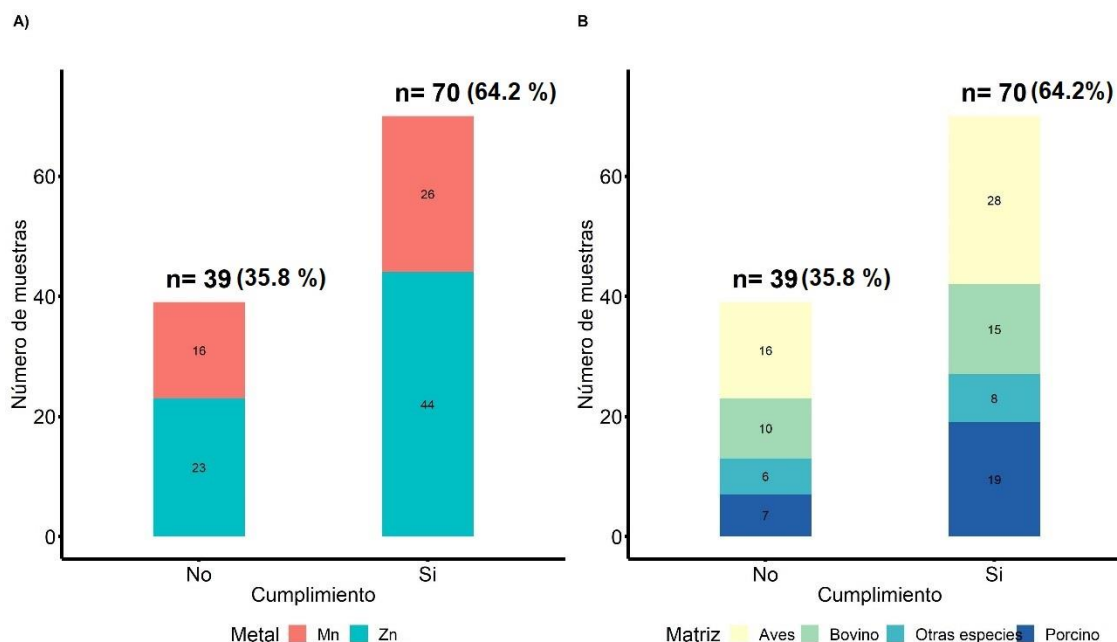


Figura 3. Comparación del cumplimiento de las muestras estudiadas en relación con los límites máximos establecidos de la empresa. (A. Cumplimiento por metal, B. Cumplimiento por matriz)

En la Figura 3 se observa que, para el conjunto de 109 muestras, 70 cumplen con los límites establecidos por la empresa (64.2 %) y 39 no cumplen con esta métrica (35.8 %). Existe un alto grado de no cumplimiento en las muestras, tomando en cuenta la producción anual aproximada de 3600 lotes, alrededor 1288 productos no cumplirían con esta especificación.

El análisis descriptivo para el desempeño del proceso de acuerdo con el límite establecido por la empresa ($\pm 10\%$) muestra que, a pesar de que los datos se distribuyen cerca del 100 % de desempeño, existe una amplia variabilidad en los mismos, lo que implica que un número importante de los valores individuales superan el límite anteriormente mencionado, esto explica el alto porcentaje de incumplimiento, que en este caso asciende al 35.8 % de las muestras, por lo que se sospecha que la principal oportunidad de mejora del proceso no se encuentra relacionada con el valor nominal de los metales presentes en productos formulados, sino, se encuentra más orientada a reducir la variabilidad en la producción.

El análisis para cada metal (Figura 3A), muestra que la proporción de incumplimiento para cada uno es muy similar, siendo de 3.4 de cada 10 casos para manganeso y de 3.8 por cada 10 casos para zinc. Tendencia que se puede deber a que parte de los productos alimenticios se formulan con ambos metales, debido a la importancia nutricional mencionada. Adicionalmente, sugiere que puede solucionarse de manera conjunta indiferentemente del metal es cuestión.

En el caso de la matriz de muestra (Figura 3B), el incumplimiento oscila desde 2.8 por cada 10 casos para porcino, hasta 4.3 por cada 10 casos para otras especies, con valores intermedios de 3.8 de cada 10 casos para aves y 4.0 de cada 10 casos para bovinos. Cabe recordar que al evaluar la entre la matriz y el desempeño, no se encontró la relación estadísticamente significativa, por lo que se podría inferir que no existe tampoco relación de este factor y el cumplimiento ya que son parámetros directamente relacionados.

De acuerdo con el análisis de datos realizado y la generación de los modelos de regresión para el desempeño con respecto a las variables carga y metal, no se observaron efectos sistemáticos que sugieran un sesgo atribuible a alguna de las causas en estudio, caso en el cual las desviaciones mencionadas serían corregibles mediante el planteamiento de un factor de corrección. El análisis de datos sugiere que los efectos aleatorios derivados de la variabilidad inherente del proceso son los responsables del alto porcentaje de incumplimiento. Por lo expuesto, este trabajo pretende brindar un enfoque de calidad que funcione como insumo para el mejoramiento del proceso productivo y permita mantener bajo control estadístico la variabilidad del proceso, evitando que la misma se convierta en una causa de incumplimiento. Por su parte las herramientas de control estadístico de proceso que se expondrán más adelante buscan generar un análisis que facilite la interpretación de datos, de manera que, funcione como base para lograr un proceso productivo más estable y robusto, el cual permita cumplir con los altos estándares que requiere el mercado.

4.1.1 Aplicación de control estadístico a los datos retrospectivos

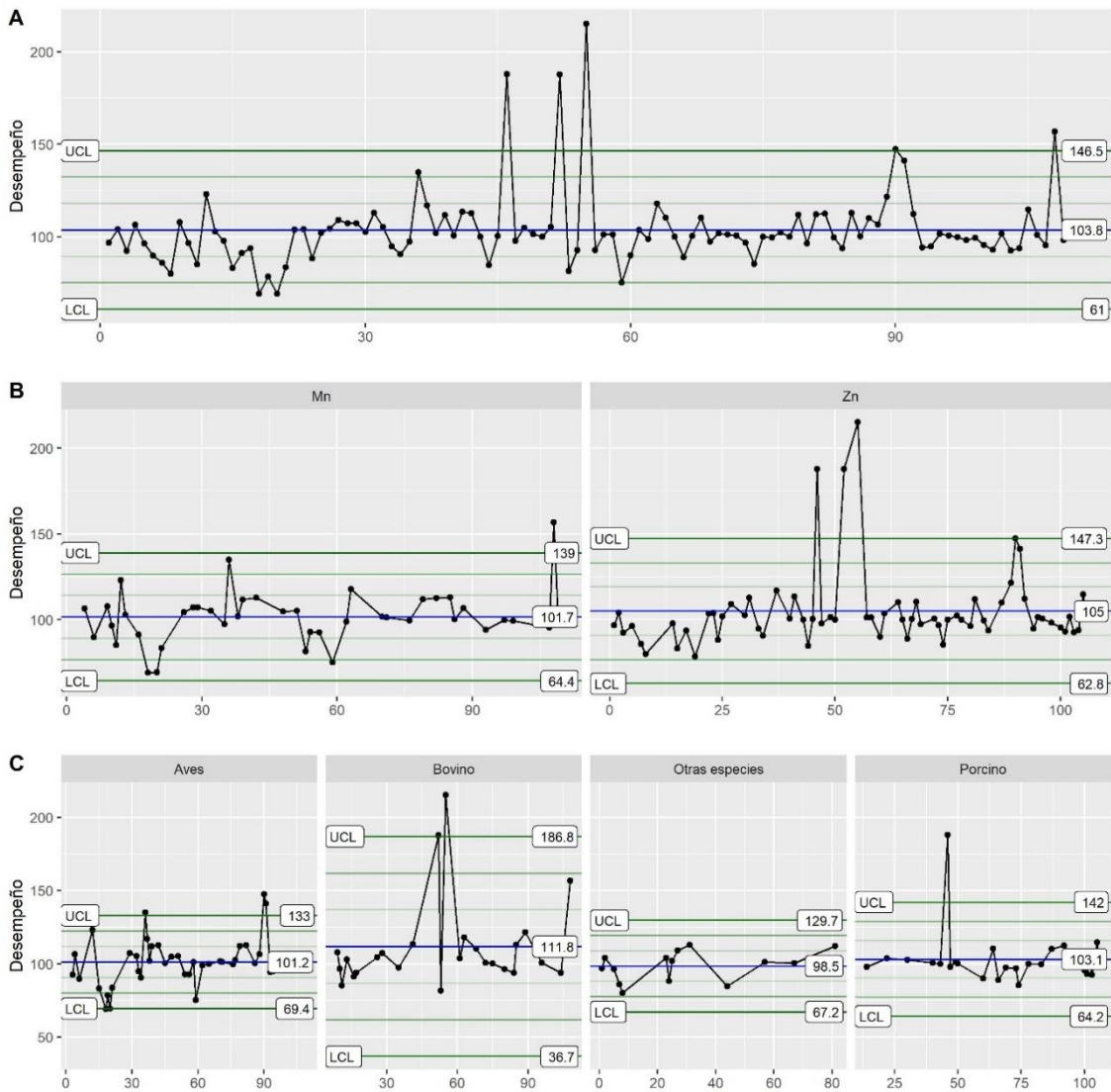


Figura 4. Gráficos de control de proceso (A. Datos totales, B. Por metal, C. Por tipo de producto)

En la Figura 4A, se puede observar los datos del proceso con sus respectivos límites, calculados a partir de la desviación estándar del proceso, se puede observar que la variabilidad propia del mismo hace que estos límites sean más amplios que los establecidos por la empresa, por ende, es de esperarse que con los límites de especificación actuales exista un alto grado de no cumplimiento. Con los límites de control del proceso establecidos a 3σ (línea verde oscura), 5 puntos excederían los límites de control, lo que significaría que el 4.59 % del total de muestras, esto se contrapone a lo que sugiere la teoría estadística sobre un proceso bajo control estadístico, ya que con este tipo de límites es aceptable solamente un

1% de incumplimiento. En el gráfico también se muestran los límites de alerta (verde claro), los cuales le permitirían a la empresa tomar medidas preventivas antes de que un lote de producto incumpla los límites de control.

en la Figura 4A se observan otras evidencias que demuestran que el proceso no se encuentra en control estadístico, como la presencia de muestras cerca del límite (muestras 20, 90) y la distribución de los puntos, la cual no es simétrica alrededor de la línea de tendencia central, la mayoría de los puntos se encuentran debajo de esta línea (muestras 70-80 y 90-105); según las tendencias exhibidas por el conjunto de datos se sospecha que los valores extremos están sesgando el valor de la media.⁷⁵

En la Figura 4B se puede observar un fenómeno que llama la atención, al comparar las gráficas de desempeño para cada metal, ya que se observa que tal y como sugirieron los resultados de la estadística descriptiva, el manganeso tiene una mayor variabilidad, ya que los datos se distribuyen más separados de la línea de tendencia central, sin embargo al contrario de lo esperado, el manganeso cuenta con límites más estrechos que el zinc, esto porque aunque el zinc cuenta con menor variabilidad en la mayoría de datos, tiene una mayor cantidad de valores extremos lo que resulta en un aumento de la desviación estándar. En general se observa un comportamiento similar a los del total de datos, donde muchos puntos se encuentran por debajo de la tendencia central. En este punto, al tratarse de una desviación unidireccional, puede ponerse en duda el origen de este sesgo en los datos, si realmente se trata de un efecto inherente de la producción o es el reflejo de un método analítico con bajas recuperaciones. Es por esto por lo que, una parte fundamental del ciclo de vida de cualquier metodología analítica, especialmente en aquellas que son ajustadas para un fin específico con parámetros distintos a los listados por un ente especializado, es su debida validación, de manera que se brinde confianza en las cuantificaciones realizadas con el mismo.⁷⁶

Finalmente, en la Figura 4C se evidencia la tendencia respecto a la matriz “bovino” que exhibe la mayor variabilidad y los límites más amplios, mientras que las otras tres matrices cuentan con límites inclusive más cerrados que los del conjunto total de datos, por lo que se puede decir que la matriz bovina posee una contribución importante al aumento de los límites del proceso, introduciendo alta variabilidad en los datos.

En general, se observa la presencia de valores extremos que sesgan los datos, aumentan la varianza y por ende ensanchan los límites de control y alerta en los gráficos. Se podría explorar la posibilidad de que la causalidad no se relacione directamente con la materia prima utilizada, sino con el método utilizado por los operarios, falta de estandarización del equipo utilizado para la formulación del producto o inclusive el método analítico utilizado para su cuantificación.

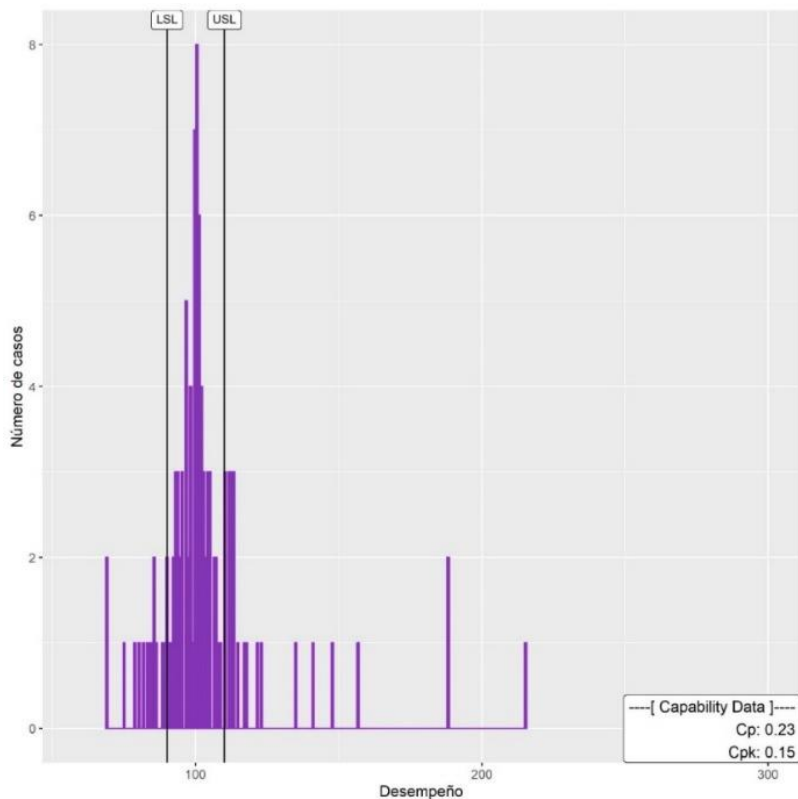


Figura 5. Análisis de capacidad para el proceso.

Las herramientas de control estadístico, como las expuestas anteriormente, son muy útiles para evaluar si el proceso productivo se encuentra dentro de control y mantenerlo de esta manera, no obstante, el hecho de que un proceso se catalogue como dentro de control no significa que pueda generar en todos los casos, productos dentro de las especificaciones de diseño. La manera de verificar que un proceso sea capaz de generar productos dentro de acotamientos de calidad específicos es utilizar indicadores de capacidad de proceso como el Cp o Cpk⁷⁷, realizar el análisis de capacidad es una buena aproximación a la realidad y una herramienta para caracterizar el proceso.⁷⁸

En la Figura 5 se observa el análisis de capacidad del proceso, el valor Cp muestra la capacidad potencial mientras que el Cpk muestra la capacidad real. Esto refiere a que el Cp se calcula en función únicamente de la variación dentro del subgrupo, si el proceso productivo cuenta con poca variación, el valor de Cp va a ser aceptable, sin importar que tan alejados están estos productos del valor de especificación esperado. Por su parte el Cpk toma en cuenta donde se ubica la producción con respecto a los límites de especificación y por esto se dice que es un índice a largo plazo o que toma en cuenta la variable tiempo. En el caso que la producción se encuentre centrada en el valor meta el Cp y Cpk debería tener el mismo valor.⁷⁹

El valor de Cp es de 0.23, un valor para este parámetro menor ,a 0.69 significa que el proceso productivo se considera no apto para producir dentro de los límites establecidos, y es necesario realizar modificaciones con la finalidad de adaptarlo a lo requerido. El valor Cpk de 0.15, la teoría indica que un valor entre 0 y 1 indica que la media del proceso está dentro de especificaciones, sin embargo, el proceso está produciendo artículos fuera de especificaciones, lo cual se refleja en la cantidad de valores extremos. Como punto de comparación muchas empresas suelen utilizar 1.33 como referencia de estabilidad, por debajo de este valor se busca realizar mejoras al proceso.⁸⁰ La diferencia entre los valores de Cp y Cpk es de 0.08, valor cercano a 0, lo que da indicios de que el proceso se encuentra centrado en el valor objetivo, pero cuenta con una alta variabilidad.

Finalmente, es importante mencionar que sería provechoso para la empresa aumentar el número de productos muestreados, ya que actualmente se toma el 1% de la producción, lo cual corresponde a un muestreo con un nivel de confianza del 68%, lo cual puede no describir el proceso de manera fidedigna, por lo que se podría recomendar aumentar el muestreo a un 4.3% para un 80% de confianza o al 9.7 % para tener un 95% de confianza.⁷³ La distribución observada en el conjunto de datos, sugiere que la causa de la no normalidad es la presencia importante de datos anómalos. Para valorar esta hipótesis, se procederá con el análisis estadístico eliminando los valores extremos con el fin de validar el posible sesgo por causa de dichos datos.

4.1.2 Desempeño eliminado valores atípicos

Los valores atípicos se encuentran frecuentemente durante la fase de recopilación de datos de los estudios de observación o experimentales. Los valores atípicos, refieren a los valores extremos que se encuentran anormalmente fuera de la pauta general de una distribución de variables. Los valores atípicos contenidos en los datos de la muestra introducen un sesgo en las estimaciones estadísticas, como la media, lo que da lugar a valores resultantes subestimados o sobreestimados.⁸¹

Se utilizan diferentes métodos para identificar los valores atípicos, entre ellos, la distancia de Mahalanobis, análisis de componentes principales, las proyecciones, los métodos adaptables, entre otros. Algunos de estos métodos utilizan la media y la desviación estándar como base, estos no se consideran apropiados, ya que son estadísticos sensibles a la presencia de valores atípicos.⁸² Por ende, se eligió un método que utiliza la mediana y el rango intercuartílico como base, ya que es menos sensible a los valores atípicos. Además, con este tipo de métodos permiten utilizar gráficos de caja para identificar los valores atípicos. En este método, se establecen los límites superiores e inferiores como 1.5 veces el rango intercuartílico sobre y bajo el tercer y primer cuartil, respectivamente.⁸³

El tratamiento estadístico identificó que el 10 % de los datos como atípicos, valor alarmante, por lo que se convierte en una necesidad tomar acciones para reducir esta tendencia. Al descartar los valores extremos, la media del conjunto de datos es de 100,2 % con una desviación estándar de 9.0. De esta manera se nota que los datos se centran en el 100 % de desempeño y se reduce significativamente la variación original ($DE = 20.7$). Con los valores atípicos eliminados se procedió a generar nuevamente los gráficos de control y el análisis de capacidad.

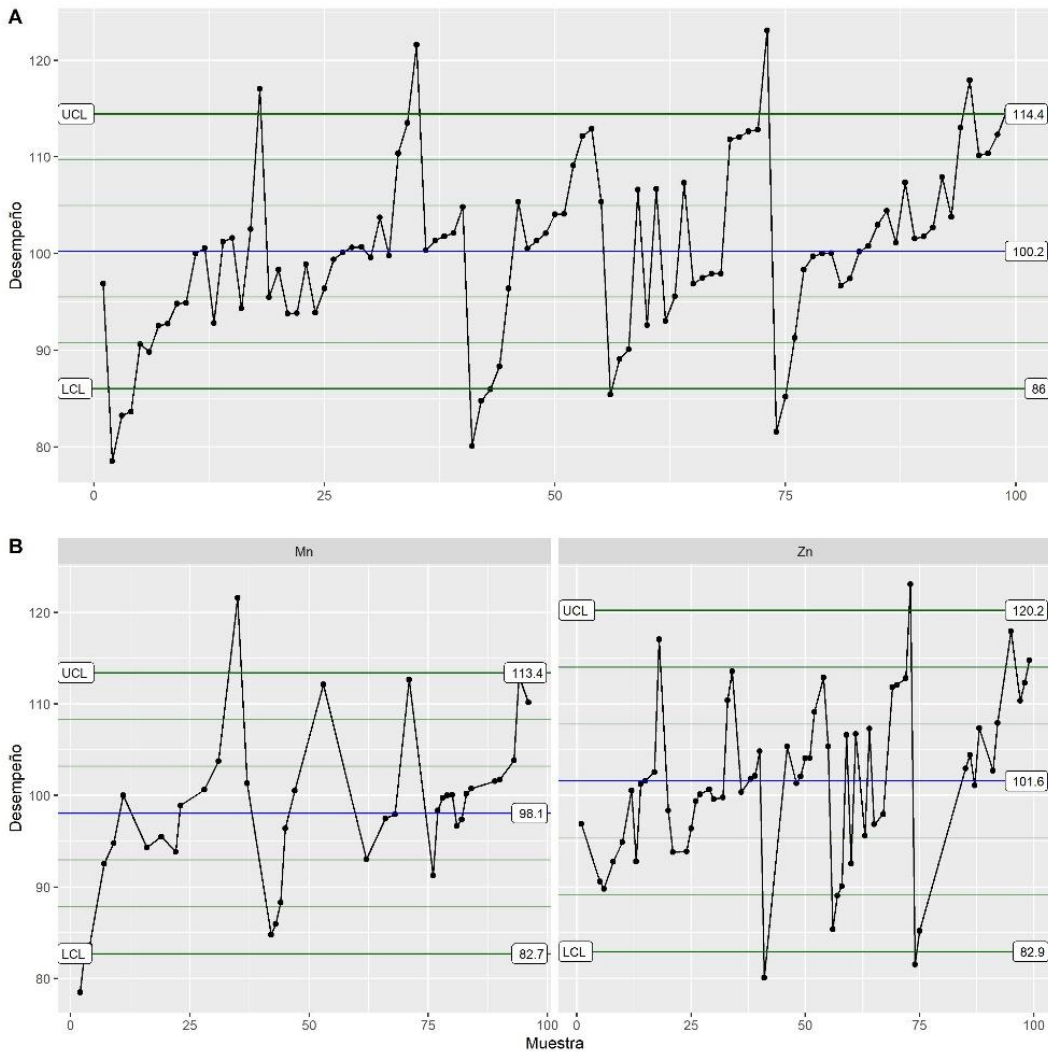


Figura 6. Gráficos de control de proceso sin atípicos (A. Datos totales, B. Por metal).

En la Figura 6, se puede observar que los límites de control son mucho más estrechos sin datos que los siguen, para el conjunto total de datos se obtuvo una reducción en los límites de aproximadamente 25% con respecto al valor central. Ya que pasó de un $\pm 40\%$ hasta un $\pm 15\%$, siendo a su vez estos nuevos límites cercanos a los límites de especificación establecidos por la empresa. Si bien es cierto el gráfico no presenta tendencias superiores o inferiores, parece existir una tendencia ascendente cada 25 casos, por lo que puede llegar a ser interesante analizar el desempeño en el tiempo o inclusive la distribución dentro de los lotes.

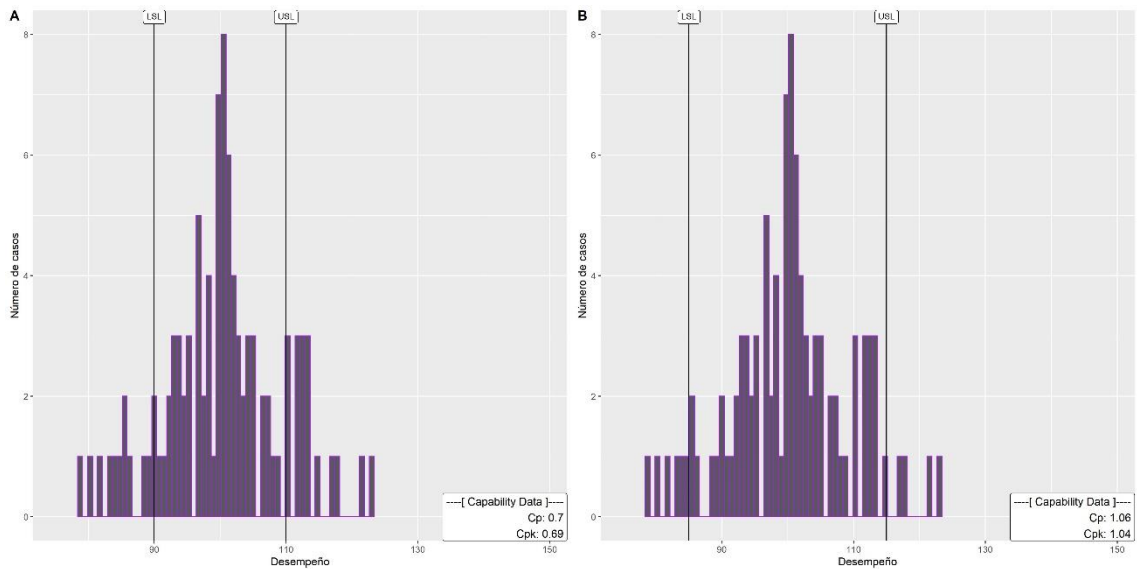


Figura 7. Análisis de capacidad para el proceso sin valores atípicos. (A. Límites de $\pm 10\%$, B. Límites de $\pm 15\%$)

En relación con la capacidad de proceso, en la Figura 7 se puede observar que, al eliminar los datos atípicos, el conjunto de datos se ajusta mejor a una distribución normal, lo cual se comprueba por la cercanía del valor de Cp y Cpk. En el caso de la Figura 7A, se observa el histograma de capacidad con los límites establecidos en $\pm 10\%$ y con solo eliminar estos valores extremos se logra mejorar el Cp de 0.23 (< 0.67) hasta 0.7 ($0.67 < Cp < 1$) lo cual significa que, aunque el proceso sigue sin ser apto para trabajar dentro de los límites establecidos, en lugar de necesitar modificaciones serias, un análisis del proceso, que permita dar seguimiento a las buenas prácticas de operación y trazabilidad podría ser suficiente para mejorarlo. Por otra parte, al analizar el caso B en el cual los límites de proceso se amplían a $\pm 15\%$, el Cp mejora aún más, hasta 1.06 ($1 < Cp < 1.33$); donde ya el proceso productivo se puede considerar apto para trabajar dentro de los límites, sin embargo, se recomienda un control estricto debido a su cercanía al valor de 1, por lo que el proceso podría salirse de control si se producen valores atípicos.

4.2 Validación

Según lo indicado por la guía para validación de métodos del ECA⁶⁶ y la guía de validación y temas relacionados de la Eurachem⁶⁰ el método seleccionado se clasifica como normalizado modificado, por lo que se procedió a realizar una validación del método mediante los parámetros establecidos en el Cuadro 5.

A continuación, se discuten los resultados de la evaluación de cada uno de estos parámetros:

4.2.1 Robustez:

La robustez del método se comprobó ejecutando el diseño experimental de Yoden – Steiner propuesto en la sección 3.3, por este medio se obtuvieron promedios por factores y se evaluó la influencia de cada una de condiciones de variabilidad en el resultado obtenido. Los siete factores escogidos y sus respectivas variaciones se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Factores críticos identificados y variaciones aplicadas para evaluación de robustez.

| Factor Escogido | Variaciones | |
|--|---|---|
| | A | B |
| Procesamiento de la muestra | Homogenizar en un molino de cuchillas durante 2 minutos | Homogenizar agitando manualmente |
| Volumen de ácido nítrico adicionado para la digestión | 10 mL | 5 mL |
| Sustancia coayudante | 2 mL de HCl | 2 mL H ₂ O ₂ al 30 %. |
| Eliminación del coayudante | 2 mL de HCl | No se adiciona nada |
| Calidad del agua | tipo I | tipo II |
| Cantidad de muestra | 0.5 g | 0.25 g |
| Enfriamiento posterior a la digestión | 20 min | Transvase inmediato |

Después de la evaluación de resultados, se concluye que el método es robusto ya que ninguna de las siete variables evaluadas presenta sensibilidad a cambios. Lo que supera el parámetro de aceptación inicial propuesto de que al menos el 80 % de los factores fueran no sensibles. Todos los datos obtenidos del diseño experimental de Yoden – Steiner, como su debido análisis pueden ser consultados en el informe de validación. (anexo 14). Estos resultados de robustez son similares a los resultados reportados por otros autores para métodos de absorción atómica.^{84, 85}

El diseño factorial de Youden implica identificar variables que podrían tener efectos significativos en el resultado del análisis y realizar cambios en el método propuesto para finalmente analizar el efecto en el desempeño.^{86,87,88,89}

Cabe hacer la salvedad que los factores además de ser seleccionados debido a que son pasos cruciales del análisis, la mayoría estos están relacionados a las pequeñas diferencias entre el método normalizado expuesto en la *Official Methods of Analysis* sección 999.10 (Plomo, cadmio, zinc, cobre y hierro en alimentos mediante espectrofotometría de absorción atómica luego de digestión por microondas)⁶¹ y el método modificado adaptado por el laboratorio. De esta manera, se logran dos objetivos al mismo tiempo, ya que se comprueba que el método se puede considerar como robusto y adicionalmente podríamos afirmar que una vez revisadas a detalle estas diferencias y obteniendo que el método no es sensible a ninguno de los cambios realizados, los resultados obtenidos por ambos métodos son equivalentes.

4.2.2 Linealidad y ámbito de trabajo

La linealidad del método se evaluó preparando curvas de calibración en un ámbito de concentración de 0 a 1.983 mg Mn /L y 0 a 1.209 mg Zn /L a partir de la cuales se establecieron modelos de regresión lineal para cada uno de los metales.

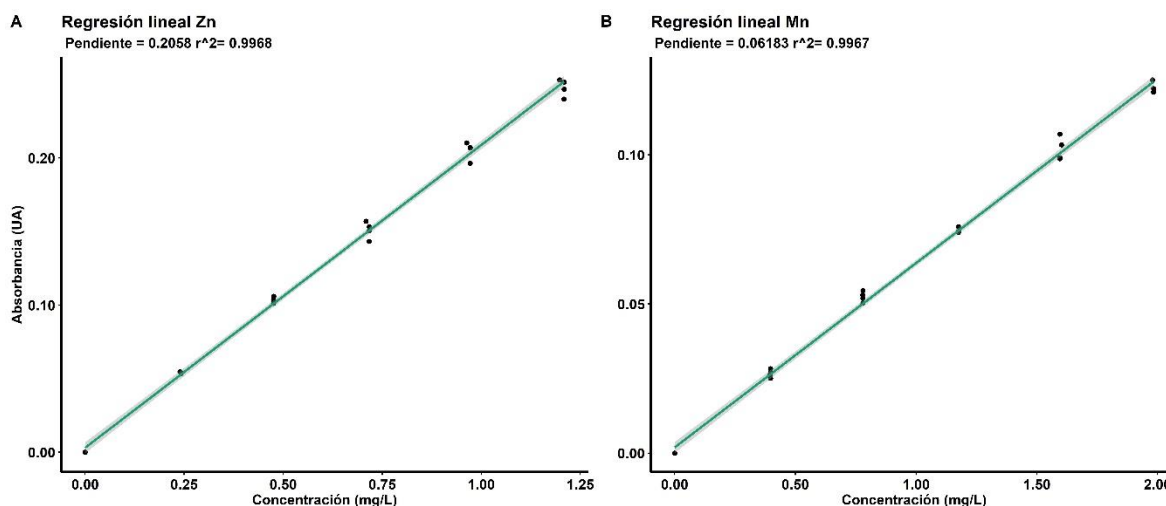


Figura 8. Regresiones lineales para Zinc y Manganese.

Según la figura 8, se verificó la significancia de la regresión lineal mediante el coeficiente de determinación de Pearson, el cual indica dependencias lineales entre dos variables, conforme más significativa es la correlación de las variables más cercano se tornará el valor del

coeficiente de Pearson al valor absoluto de uno. Esta verificación fue satisfactoria para ambos metales obteniendo valores cercanos a uno (0.9967 para Mn y 0.9968 para Zn), lo que indica una correlación positiva.⁹⁰ El coeficiente de Pearson por sí solo no es suficiente para evaluar la validez del modelo de regresión lineal por lo que otro aspecto fundamental lo constituye el análisis de la heterocedasticidad, donde se exploran los datos del modelo en búsqueda de evidencia de homocedasticidad, es decir, que las varianzas de los datos sean iguales a lo largo de la línea de regresión.⁹¹ Esto se puede comprobar haciendo uso de pruebas como la de Levene o la Bartlett, las cuales mostraron que existe una homogeneidad de varianza en las variables respuestas que componen el modelo de regresión lineal ($p > 0.05$). El siguiente punto para evaluar la linealidad de las regresiones es la sumatoria de los residuales, valor que según la literatura debe ser cercano a cero para comprobar la linealidad de una regresión⁹², en este caso se obtuvieron valores en magnitudes de 10^{-18} para ambos metales, lo cual puede considerarse cercano a cero. La literatura estadística también indica que estos residuales deben comportarse de manera normal, lo cual se comprobó mediante una prueba de normalidad y se obtuvo un valor p mayor a 0.05. Lo cual, en conjunto con los datos obtenidos para coeficiente de Pearson, la comprobación de homocedasticidad y la sumatoria de residuales cercano a cero, comprueban la linealidad de los modelos de regresión generados a partir de las curvas de calibración según lo expuesto en la literatura por autores como Miller y Miller.^{92,93}

4.2.3 Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para el análisis se determinaron mediante el método de error estándar del intercepto, conocido también como método de Miller y Miller, el cual además de ser bastante recomendado por literatura analítica, es utilizado con frecuencia en las validaciones debido a la simplicidad de sus ecuaciones y a que permite aislar de manera eficiente las señales del ruido que pueda generar el equipo.^{92,93} Hay que mencionar que debido a la naturaleza de la espectrometría de absorción atómica la determinación de los límites debe realizarse de manera experimental, el método de Miller y Miller busca realizar una corrección del ruido de fondo haciendo uso de las siguientes ecuaciones.⁹⁴

$$LD = 3.3 \frac{\sigma}{m} \text{ (Ecuación 1.)}$$

$$LD = 10 \frac{\sigma}{m} \text{ (Ecuación 2.)}$$

Donde:

σ = desviación estándar de la regresión

m = pendiente de la curva de calibración

Según la guía para validación de métodos de la Organización Panamericana de la Salud y el Ministerio de Salud y como se ve reflejado en las fórmulas, se busca establecer una relación 1:3 y 1:10 para el LD y LC respectivamente.⁹⁵ Para las regresiones preparadas para manganeso y zinc se obtuvieron los siguientes límites de detección y cuantificación.

Cuadro 8. Límites de detección y cuantificación para curvas de calibración de zinc y manganeso.

| | | LD | LC | Primer patrón de la regresión lineal |
|-----------|-----------------------|-------|-------|--------------------------------------|
| Mn | Curva (mg/L) | 0.048 | 0.145 | 0.397 |
| | Matriz (mg/Kg) | 48 | 145 | 397 |
| Zn | Curva (mg/L) | 0.029 | 0.087 | 0.242 |
| | Matriz (mg/Kg) | 29 | 87 | 242 |

Existen distintos métodos para determinar los límites de detección y cuantificación de un método, el elegido en este caso, se denomina error estándar y toma en cuenta el comportamiento de todos los puntos la regresión lineal de manera integral por lo que se estableció como parámetro de aceptación que los límites se encuentren por debajo de la concentración establecida para el primer punto de la curva. Dicho criterio es cumplido por ambas regresiones según se puede observar en el cuadro 8.⁹⁶ Con la obtención del límite de cuantificación en matriz y la conformidad de la linealidad en el ámbito de trabajo, se obtiene un ámbito de trabajo lineal en matriz de 0,145 mg Mn/L – 1,983 mg Mn/L y 0,087 mg Zn/L – 1,209 mg Zn/L.

4.2.4 Recuperación, veracidad y especificidad

Se prepararon dos tipos de controles distintos: los controles instrumentales y de proceso, con la finalidad de verificar la recuperación. , los controles instrumentales fueron preparados utilizando cristalería calibrada a partir de material de referencia certificado (MRC). Los controles de proceso se prepararon a partir sales que contuvieran el analito de interés, sulfato de manganeso monohidratado con una pureza del 99.9 % para el manganeso y sulfato de zinc pentahidratado con una pureza del 99.5 % para el zinc. De estas sales mencionadas, se pesó una cantidad conocida (cercana a 0.25 g) y se les aplicó el mismo tratamiento que a una muestra. Finalmente, los controles de matriz enriquecida refieren a muestras reales a las cuales se les realizó una adición estándar de MRC.

Todo esto con el fin de evaluar la recuperación del analito mediante el método validado. El criterio de aceptación para estos controles es oscilar entre 90 y 110 %, parámetro establecido tomando en cuenta las concentraciones usuales en mg/kg que presentan las muestras y lo sugerido por el CODEX alimenticio.⁶⁷

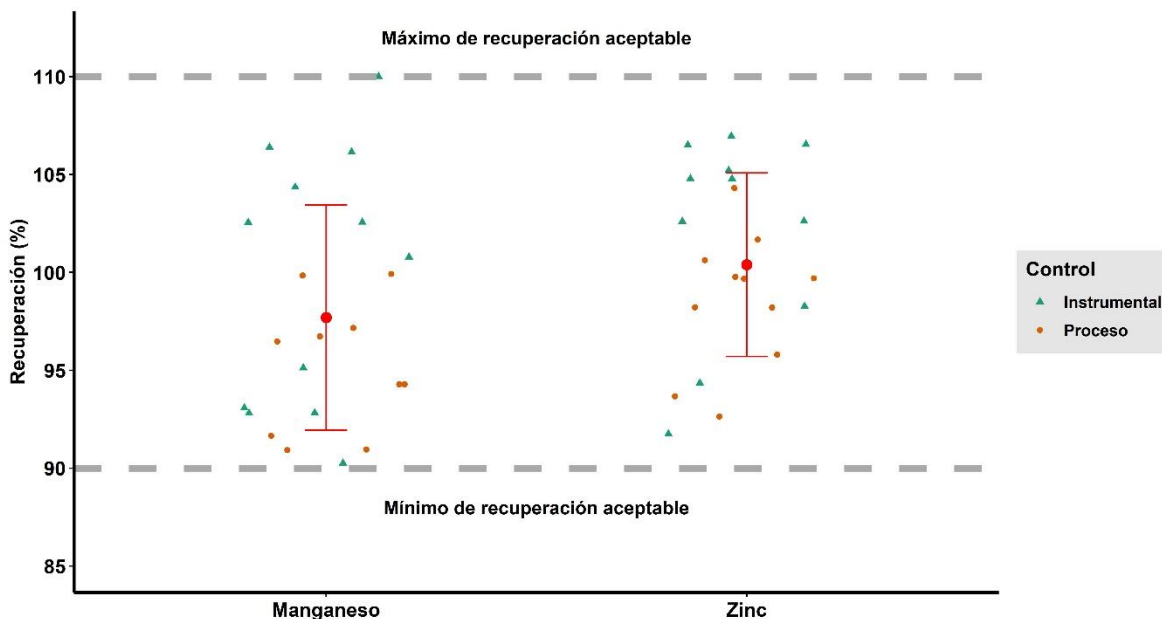


Figura 9. Distribución de los controles instrumentales y de proceso

En la figura 10 se puede apreciar que todos los porcentajes de recuperación, máximos y mínimos obtenidos se encuentran dentro de rango de aceptación, por lo que se puede asegurar que todos los controles registrados se consideran aceptables.

La veracidad usualmente refiere a la proximidad entre el valor “real” y el valor obtenido por el método validado, esto se puede evaluar por distintos medios, lo usual es adquirir material de referencia certificado atinente a la matriz de interés. En este caso, no fue posible acceder a un MRC, por lo que se siguió lo reportado en otros estudios de validación de métodos de ensayo, como los de Cañez Carrazco, Rodríguez S.C. *et al*, Rodríguez, *et al* y guías de entes como CENAM y IUPAC^{97,98,99,100,101} que han utilizado el porcentaje de recuperación mediante las adiciones estándar como un método alternativo para la validación de la veracidad. Tomando en consideración que para este estudio se evaluaron 44 controles de recuperación para ambos analitos, en días y muestras distintas, se puede sugerir que los valores obtenidos proporcionan un nivel adecuado de representatividad para el parámetro de desempeño en cuestión.

Con la finalidad de evaluar la veracidad y especificidad se prepararon muestras de matriz enriquecida, que refieren a juegos de tres repeticiones, de las cuales dos se analizaron como muestra y a una se le realizó una adición estándar, finalmente se cuantificó la recuperación de este analito adicionado, restando a la tercera muestra el promedio obtenido por las primeras dos. El procedimiento descrito anteriormente, no solo permite evaluar la veracidad del método sino también la especificidad, ya que este parámetro busca probar que no existen señales parásitas o interferencias enmascarantes en el método de cuantificación que puedan interferir en la señal del analito. Tal como recomienda la guía de validación de método analíticos⁹⁶ cuando la composición de la muestra es variable en términos de composición (e.g., productos de origen natural o biológico) se deben realizar pruebas de selectividad con muestras independientes de fuentes distintas.

Para este estudio se tomaron ocho muestras que cumplieran con lo indicado anteriormente y se utilizó como criterio de aceptación el mismo rango establecido para recuperación. Como se puede observar en la figura 10, los resultados para las pruebas de recuperación realizadas para probar la veracidad y la especificidad son satisfactorias, ya que las recuperaciones se encuentran dentro de los valores establecidos, tanto de manera individual como en su promedio, con lo que se descarta que exista alguna señal que interfiera con la cuantificación

del analito proveniente de la composición de las muestras. Lo descrito en este estudio coincide con lo reportado por la IUPAC (2001) y Compañó-Ríos(2002) como una buena especificidad para un método.^{102,103}

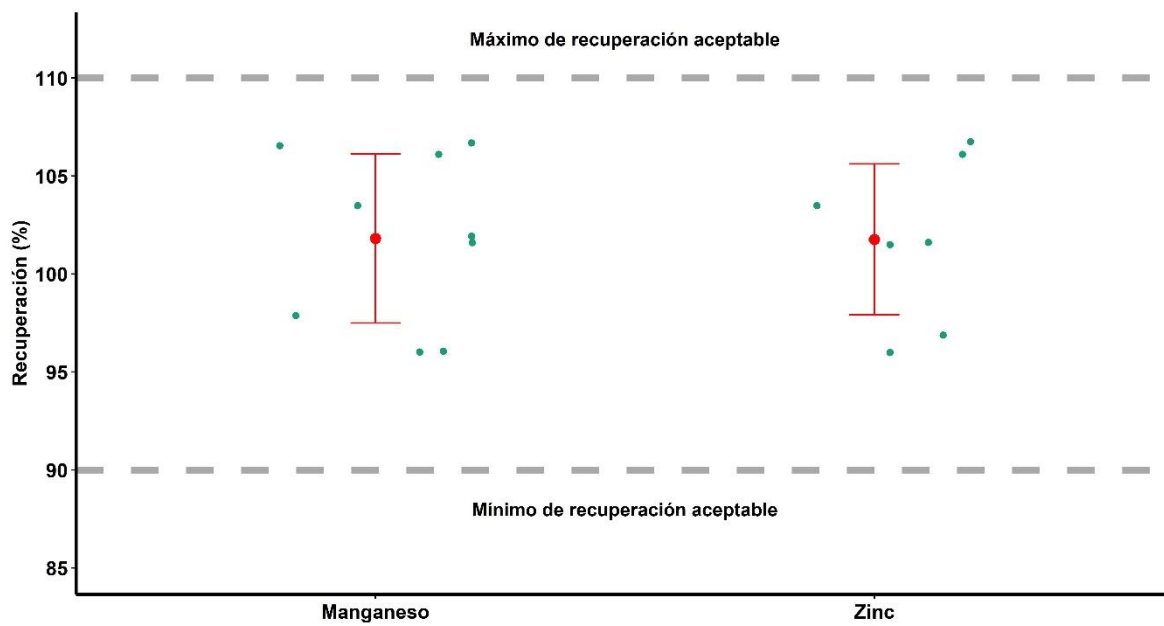


Figura 10. Distribución de los controles de matriz enriquecida.

4.2.5 Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)

4.2.5.1 Repetibilidad

Con la finalidad de validar la repetibilidad de los analistas para un método, se recomienda analizar de tres a seis muestras^{99,104,105} en las mismas condiciones experimentales, el mismo día, por el mismo analista, con los mismos reactivos, el mismo equipo, y los mismos parámetros en un intervalo corto de tiempo. Para este estudio se analizó una muestra por quintuplicado con contenido tanto manganeseo como zinc y fue probado por tres analistas independientes de manera paralela para asegurar la uniformidad en las condiciones ambientales y se obtuvieron los resultados expresados en la figura 12.

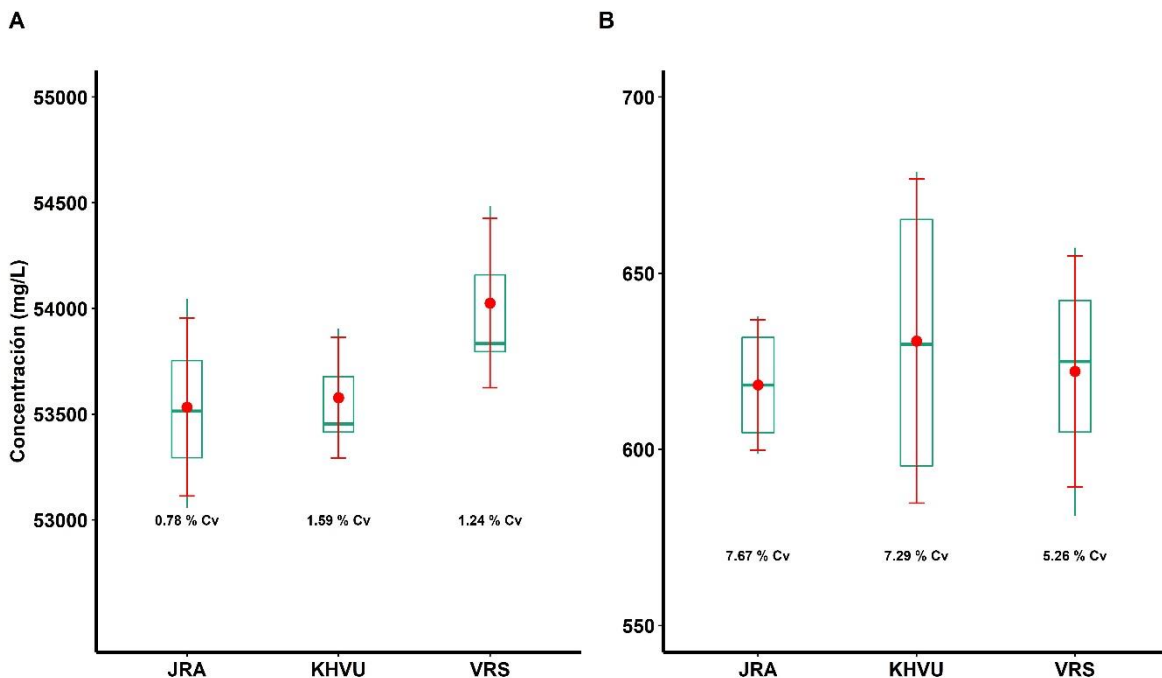


Figura 11. Dispersión de los quintuplicados de los analistas para pruebas de repetibilidad.

A partir de los resultados experimentales de los diferentes analistas se calculó el promedio y la desviación estándar de cada uno, para cada metal y se procedió a evaluar el porcentaje de coeficiente de variación. Se tomó como criterio de aceptación máximo 8% de CV, el cual se estableció con respecto a la ecuación de Horwitz tal como recomienda el CODEX para concentraciones de partes por millón. Otros autores han utilizado valores similares, como en los estudios de Rodríguez *et al*⁹⁹ o Alvarado *et al*⁹⁸ y, de forma especialmente relevante, Pérez y Alvarado¹⁰⁶ que trata de una cuantificación mediante absorción atómica de metales como zinc, hierro y cobre, por lo que presenta una alta afinidad con este proyecto. Tomando en cuenta este criterio de aceptación, en la figura 12 se observa que los tres analistas presentan resultados satisfactorios para ambos metales y que los coeficientes de variación para manganeso son, en general, menores que los de zinc. ($p < 0.05$)

4.2.5.2 Precisión intermedia

El parámetro de precisión intermedia permite estudiar la variabilidad de un método en condiciones operativas distintas, específicamente en este estudio se evaluó el parámetro analistas, ya que se mantuvo constante la muestra, el equipo y el lapso. Para comprobar la precisión intermedia de los analistas se utilizó la prueba de Levene, que evalúa la homogeneidad de varianza para dos o más grupos de datos.¹⁰⁷ El principal supuesto para confiar en los resultados de la prueba de Levene es la normalidad de los conjuntos de datos, por lo que se comprobó primeramente la normalidad de los conjuntos de datos de cada analista utilizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, el resultado de esto se puede observar en el anexo 14, donde se puede afirmar que las varianzas de los tres analistas se comportan de manera normal y luego se aplicó la prueba de Levene la que confirma que no existe diferencia estadísticamente significativa en las varianzas de los analistas, por lo que siempre que se mantengan las condiciones analíticas, para la cuantificación de manganeso o zinc el procedimiento se puede llevar a cabo con distintos analistas y obtener resultados igualmente válidos.¹⁰⁸

4.2.6 Efecto Matriz

Este parámetro permite evaluar si existe interferencia por parte de la matriz analizada, en este caso, preparados de alimento animal, matriz de composición compleja sobre la cual no existen estudios específicos de validación, por lo que es fundamental comprobar que no existe algún efecto que vaya en detrimento de la cuantificación ya sea de manera positiva o negativa.

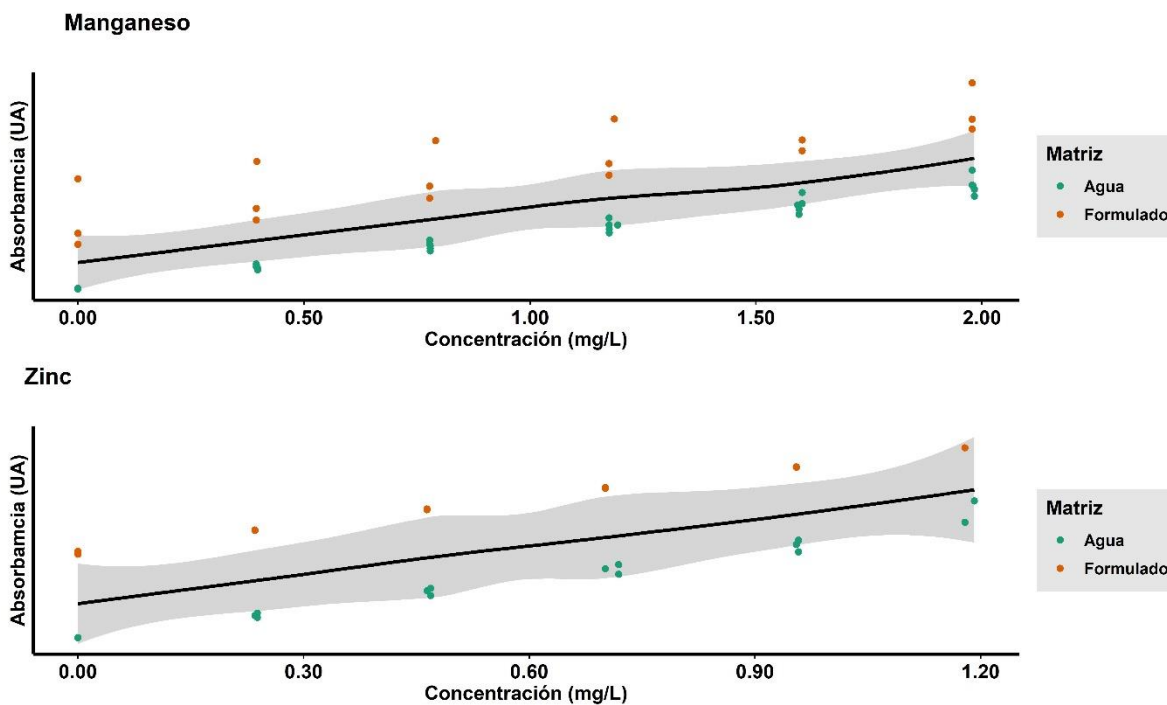


Figura 12. Comparación de las pendientes de las curvas de calibración.

En la figura 13 se comparan las pendientes de las curvas de calibración preparadas de manera regular y las curvas preparadas mediante adición estándar sobre la matriz de alimento formulado, para manganeso se obtuvo una pendiente promedio en agua de 0.05646 (n= 5) y 0.05650 (n=5) en matriz. Por su parte para Zinc 0.1838 (n= 3) para curvas en agua y 0.1860 (n= 3) para curvas en matriz. A los grupos de pendientes se les evaluó la normalidad y la homogeneidad de varianza con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Adicional a la prueba gráfica expuesta se prueba la ausencia de un efecto por parte de la matriz tanto para manganeso como para zinc mediante una prueba T, en la cual la hipótesis nula es que la diferencia entre las medias es igual a cero. ($p > 0.05$) La metodología y los resultados presentados concuerdan con lo expuesto en guías mencionadas anteriormente y textos como el de Bader, M.¹⁰⁹

4.3 Análisis de datos obtenidos mediante el método validado

Análogo a lo explicado en la sección 4.1 se probó la normalidad de los subconjuntos de datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk, comprobando que todos se comportan de manera no normal ($p < 0.05$) lo que muestra una concordancia entre los datos retrospectivos y las

muestras analizadas. A su vez, esto muestra la necesidad de utilizar pruebas no paramétricas, también denominadas pruebas de distribución libre.¹¹⁰

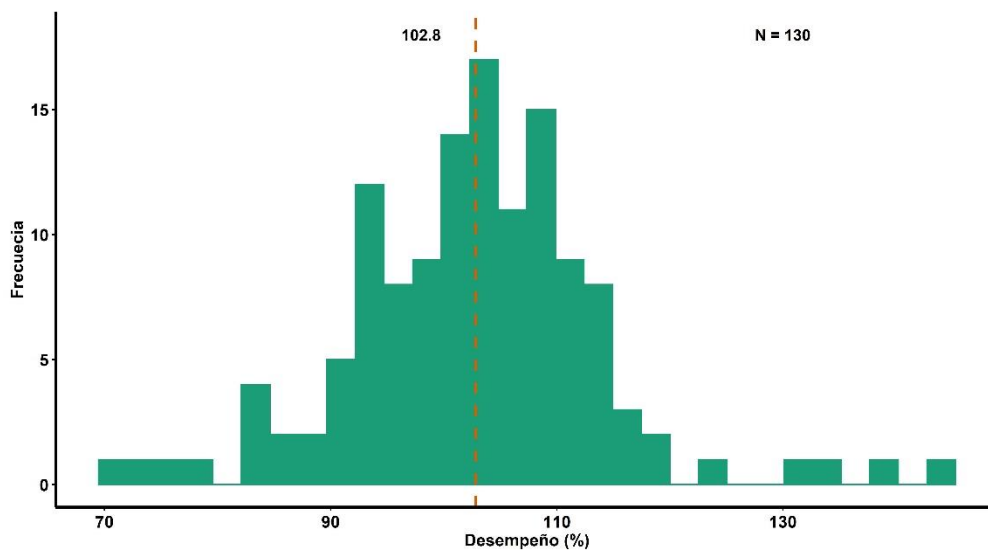


Figura 13. Distribución de muestras analizadas mediante el método validado.

En la figura 14 se plasma la distribución de los datos obtenidos a partir de las muestras analizadas con el método validado, a estas se les aplicaron permutaciones y regresiones lineales relacionando la carga con el desempeño del lote análogo a los realizado en la sección 4.1 y nuevamente muestran relaciones no significativas ($p > 0.05$) y por consecuencia ajustes R^2 bastante pobres en todos los casos. ($R^2 < 0.05$). Tomando en cuenta la evidencia encontrada en el análisis retrospectivo y lo sugerido por estos nuevos datos, se puede concluir con seguridad que no existe correlación significativa entre estas variables.

Con respecto al desempeño de la totalidad de las muestras se obtuvo una media de 102.8 % con una desviación estándar de 11.3 %. Al comparar estos valores con lo obtenidos en el análisis retrospectivo, la media es similar, sin embargo, la desviación estándar se redujo un de 20.7 a 11.3, lo cual sugiere que fueron efectivas las sugerencias y medidas implementadas por la empresa¹¹¹ y es de esperar que se redujeran la cantidad de valores atípicos y el no cumplimiento.

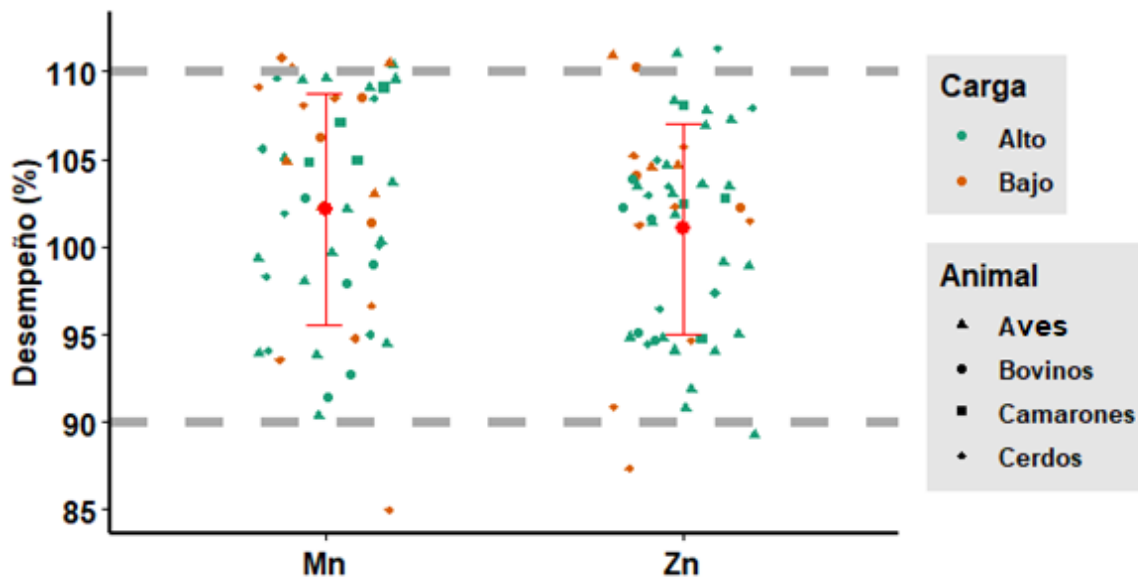


Figura 14. Distribución del desempeño con respecto al metal para las muestras analizadas.

En cuanto al comportamiento del desempeño en la figura 15 se puede detallar que la media y desviación para los datos agrupados por su respectivo metal son de 102.2 (DE = 12.8) para manganeso y 103.3 (DE = 9.7) para zinc.

Llama la atención el caso del zinc, donde la desviación bajó de 23.3 hasta 9.7, reduciéndose un 58%, probando con Levene, existe diferencia significativa en la varianza del grupo de datos retrospectivos y las muestras analizadas ($p < 0.05$). Las medias nuevamente se encuentran ubicadas cercanas al 100 % y al reducir la desviación en ambos casos, aumenta la probabilidad de que los valores se distribuyan dentro de los límites establecidos.

En cuanto al análisis del desempeño de las muestras agrupadas por matrices según lo especificado en la sección 4.1, se observan medias cercanas al 100% con la diferencia que en este caso se refleja una mayor homogeneidad entre muestras, por lo que, de manera análoga a lo reflejado por el grupo completo de datos, existe una disminución de las desviaciones en todos los casos. Algunas reducciones tan drásticas como un 50% del valor original. La permutación indica que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$, $F=0.67$) para la media de desempeño con respecto a la categoría de matriz.

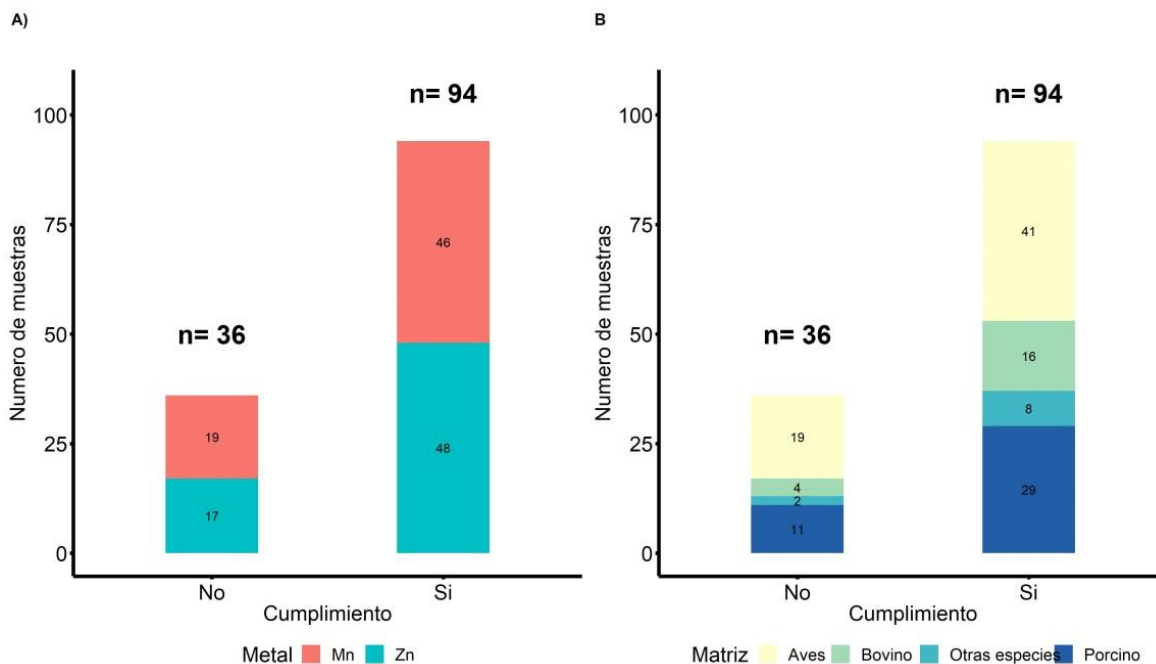


Figura 15. Comparación del cumplimiento de las muestras analizadas en relación con los límites establecidos por la empresa. (A. Cumplimiento por metal, B. Cumplimiento por matriz)

La figura 16 muestra la categorización de acuerdo con el cumplimiento para el conjunto de 130 muestras, donde un 72.3 % de estas cumplen con los límites establecidos, dicho indicador mejoró de manera significativa al compararlo con el incumplimiento reportado para el análisis inicial, una mejora del 8.1 % en cumplimiento del proceso es un buen indicador según textos de gestión de la calidad.¹¹²

Al analizar de manera independiente el incumplimiento por metal (Figura 15A), se observa que el mismo corresponde a un 2.9 de cada 10 casos para manganeso y 2.6 de cada 10 casos para zinc. En cuanto al agrupado por matriz (figura 15B), para porcino y aves el incumplimiento se mantuvo similar al reportado anteriormente, en el caso de bovinos y otras especies se redujo 1.5 y 1.8 de cada 10 casos respectivamente.

Finalmente, utilizando pruebas inferenciales se determinó que no existe una diferencia significativa de las medias de desempeño con respecto al tipo de matriz trabajada ($p > 0.05$). No existe una clara tendencia de la media a estar por encima o por debajo de los valores esperados, por lo que se generaron sugerencias para el control de calidad que permitan mejorar constantemente el proceso productivo.¹¹³

4.3.1 Control estadístico de las muestras

Con base a lo observado durante el análisis retrospectivo, antes de proceder con el análisis estadístico se realizó el tratamiento necesario para detectar y eliminar los datos atípicos del conjunto de datos. De esta manera, se detectaron solamente 8 datos atípicos (6%) lo cual es un indicador positivo con respecto a la variabilidad del proceso, ya que este parámetro se redujo porcentualmente respecto al análisis retrospectivo.

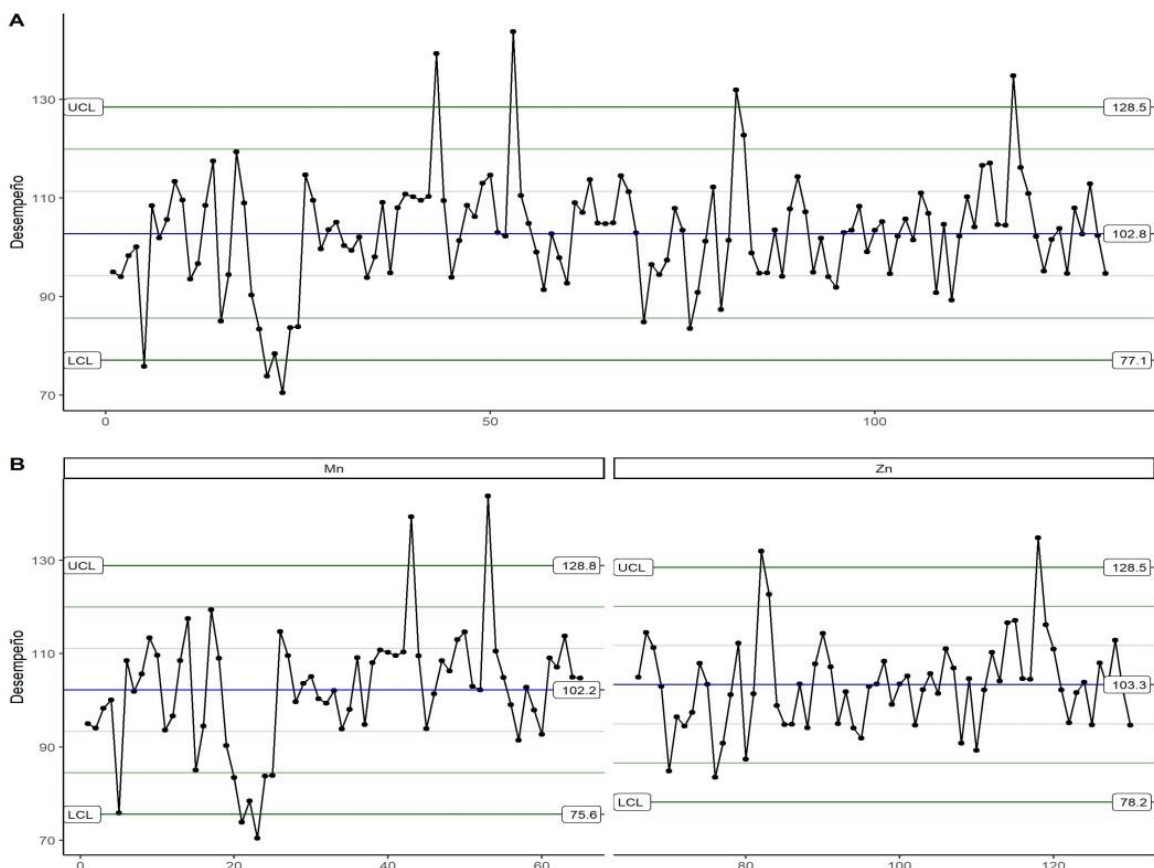


Figura 16. Gráficos de control de proceso para las muestras analizadas sin datos atípicos (A. Datos totales, B. Por metal)

Se generaron gráficos de control análogos a los de la sección 4.1.1, donde se muestran los límites de alerta establecidos a 2σ (verde claro) y los límites de control de proceso a 3σ (verde oscuro). En la figura 17A y 17B se resalta la magnitud de los límites de control, ubicados aproximadamente en 128.5 y 77.1. Al comparar los límites de la totalidad de los datos con los mismos segregados por metal se observa que son casi idénticos, lo que indica que tanto el promedio como la variación de las muestras comporta de manera relativamente

homogénea, este agrupado por metal o no. Otro punto importante por resaltar es el estrechamiento de los límites al compararlos con los obtenidos durante el análisis retrospectivo de datos (i.e., 146.5 % y 61 %), lo cual es una consecuencia directa de la reducción en la desviación estándar de las muestras, lo que indica que ahora los datos se agrupan más cercanos a la media. Toda esta evidencia indica que en la actualidad el proceso se ajusta mucho mejor a los límites establecidos y, gracias a los esfuerzos de la empresa enfocados en el control de calidad, las recomendaciones realizadas en este proyecto y la mejora continua, se logró reducir considerablemente la variación presente en el proceso. En contraste con lo expuesto por los datos iniciales, en la actualidad, el proceso se encuentra bajo control estadístico.¹¹⁴

No hay ninguna tendencia alarmante en los gráficos de la figura 17. Se observa una distribución homogénea de las muestras alrededor de la media, no se notan acumulaciones anormales de puntos, no se observan tendencias unilaterales y, en su mayoría, las muestras se encuentran dentro de los límites de alerta y de control, del total de 122 puntos, 7 se localizan fuera de estos límites, valor que corresponde al 5 % y sigue incumpliendo el parámetro de 1% esperado en una producción a 3σ .

La distribución por tipo de producto se omitió debido a que, además de no observarse ninguna tendencia, se evidenció en el análisis inicial que cada matriz tiene una variabilidad inherente que puede estar dada por lo minerales o la base alimenticia que incorpora la premezcla. Por otra parte, como se comentó anteriormente, la distribución de las muestras está dada por la demanda de la empresa y por ende la mayoría de las muestras está concentrada en los productos para aves y porcinos, mientras que bovinos y otras especies registran números de muestra de 14 y 9 casos, respectivamente.

Gráficos como los reflejados en la figura 16 son de gran utilidad ya que permiten identificar situaciones particulares y tomar decisiones sobre las mismas. Por ejemplo, las 7 muestras que se encuentran fuera de los límites de control se podrían particularizar y realizar un análisis de causa-raíz para determinar cuáles fueron las variables involucradas el día de su producción y por qué se encuentran fuera de especificación. Un ejemplo aún más específico se puede observar entre las muestras 21 a 25, donde se observa tanto en la figura 17A como 17B una caída en los puntos, con 2 muestras fuera de los límites de control y los otros tres fuera de

los límites de alerta, los datos reflejan que las cinco muestras pertenecen a un mismo lote identificado como lote “E” producido el 9 de marzo del 2020. Por ende, podría analizarse si ese día existió algún cambio en el proceso productivo, el mezclado, materia prima o inclusive personal para identificar una causa probable y establecer alguna medida preventiva para evitar que vuelva a generarse la situación. Ergo, un gráfico de control como la figura 17 es más útil para caracterizar el proceso que la figura 4, ya que brinda información real y particular. Su principal importancia radica en que permite mantener el proceso en control estadístico, ya que si una muestra supera el límite de alerta se puede iniciar un proceso de monitoreo y si llega a sobrepasar el límite de control permite tomar acciones y análisis concretos, de manera que se subsane la situación y se prevenga para futuras ocasiones.

En general, con base en los gráficos de control se puede decir que la empresa cuenta con un proceso controlado y que mejoró de manera considerable durante este proyecto. Refiriéndonos al índice de capacidad el mismo se mantiene en 0.7 según lo mostrado en la figura 7 esto posiblemente debido al ajuste no perfecto del modelo al tratarse de datos no normales. Cabe mencionar que aunque 1.33 es un valor ampliamente aceptado para este índice, en la mayoría de situaciones un C_p (y C_{pk}) >1 es más que suficiente y puede considerarse confiable siempre y cuando el proceso no cuente con repercusiones críticas, como lo es el caso de los medicamentos o diámetros de precisión.

Con el comportamiento observado en las muestras y la mejora exhibida, actualmente la empresa podría establecer como meta alcanzar el valor de 1 para su C_p requiriendo básicamente monitoreo continuo y pequeños ajustes de ser necesario.¹¹² Sin embargo, siempre es importante analizar la relación costo benéfico de la mejora y que tan crítica puede llegar a ser la posible mejora.¹¹⁵

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Se evidenció que el análisis retrospectivo realizado (2018-2020) fue una herramienta de gran utilidad, la cual permitió analizar datos en un periodo amplio de tiempo, más de lo que pudo haber permitido un estudio puntual. De esta manera, se caracterizó el comportamiento del conjunto de datos como no normal y se orientó el estudio hacia la utilización de pruebas no

paramétricas. Se probó que no existe evidencia que sugiera una diferencia estadísticamente significativa en el desempeño del proceso con respecto a la carga del lote, metal o matriz; no obstante, se observaron ligeras tendencias dentro de cada grupo particular.

El análisis retrospectivo evidenció la existencia un grado significativo de incumplimiento (35.8%) de los límites establecidos por la empresa ($\pm 10\%$). En términos generales, más de un tercio de la producción se encontraba fuera de especificación. Se propuso la alta variabilidad del proceso como causa asignable a este fenómeno, ya que el mismo presenta una media de 103.8%, valor cercano al 100 % objetivo, pero con una desviación estándar para la media de 20.8%

Se detecta la presencia de gran cantidad de valores atípicos (i.e., 10%), el tratamiento estadístico de esto propicia un mejor ajuste del proceso a los límites de especificación y una mejoría en el índice de capacidad, sin embargo, al compararlo con valores típicamente aceptados para dicho índice, el proceso sigue sin ser óptimo.

Al no existir correlaciones reales entre los factores mencionados en el proceso y debido a que no existe una tendencia clara en la producción, resulta imposible proponer un efecto sistemático asignable, por lo que se generaron recomendaciones que permitan visibilizar el espacio de mejora e incorporarlo al proceso de mejora continua de la empresa. Se le recomendó a la empresa buscar la estandarización del proceso y mantener un monitoreo constante haciendo uso de herramientas como los gráficos de control.

El proceso de validación del método analítico para la determinación de zinc y manganeso mediante absorción atómica de llama utilizando la digestión microondas fue satisfactorio, ya que se cumplieron los parámetros de desempeño establecidos. Con este proceso se comprobó que se trata de una metodología robusta ya que ninguna de las variables críticas planteadas presenta sensibilidad a cambios y, a su vez, se comprobó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el método normalizado y el método aplicado por el laboratorio. Se probó que el mismo no se ve influenciado por efecto matriz, por lo que cuenta con buena selectividad. Se demostró que los analistas pueden ejecutar el método dentro del rango aceptado, sin variabilidad significativa entre ellos. Todos los controles tanto de matriz enriquecida como controles de masa y lectura preparados para evaluar el método se encontraron dentro de los límites de especificación establecidos

Se estableció que el ámbito de trabajo lineal para el método va desde los 145 mg Mn/Kg a 1983 mg Mn/Kg y 87 mg Zn/Kg a 1209 mg Zn/Kg. No obstante, las muestras que presenten concentraciones superiores a este rango pueden ser ajustadas para su cuantificación dentro del ámbito lineal de trabajo mediante una dilución. Cuando este sea el caso, se recomienda utilizar factores de dilución analíticamente razonables, es decir que la alícuota seleccionada sea representativa para evitar introducir incertidumbre innecesaria en la cuantificación. La incertidumbre porcentual usual para el método es de 4.5%, obteniendo un valor de 9% para la incertidumbre porcentual expandida con un factor $k=2$.

Se preparó un informe de validación como insumo para el sistema de calidad del LASEQ, al igual que un informe para la empresa y se adjuntan como anexo, al igual que todos los scripts, bases de datos y documentos de salida generados en R estudio.

El análisis de muestras durante 3 meses del año 2021, posterior a la reunión para exponer el estado de la producción y las recomendaciones, evidenció una mejora generalizada con respecto al comportamiento exhibido durante el análisis retrospectivo lo que reflejó del compromiso con la calidad por parte de la empresa. Se observó mejora en el cumplimiento del proceso (8%), la media se mantuvo similar, lo que indica que el proceso sigue centrado sobre su valor objetivo y se redujo la desviación estándar a aproximadamente la mitad del valor exhibido en el análisis inicial. Los gráficos de control se observan mejor ajustados al proceso, por lo que son de mayor utilidad y permiten tomar decisiones realistas sobre el proceso.

En la actualidad, se cuenta con un proceso productivo que aún no es totalmente capaz de producir bajo los estrechos límites de especificación impuestos por la empresa, sin embargo, con límites de control establecidos a 3σ (capacidad real del proceso) se encuentra en control estadístico y muestra señales de mejora.

El proyecto evidenció la importancia de llevar a cabo un proceso de validación de los métodos cuando se realice alguna modificación a un método estandarizado. Por esta razón, se recomienda al laboratorio mantener las condiciones experimentales y retroalimentar la información de validación corriendo pruebas de robustez, repetibilidad y controles matriz de manera periódica. Adicionalmente, se recomienda, de ser posible, buscar la acreditación del

método analítico, utilizando como insumo el informe de validación y este trabajo, ya que se trata de un método robusto, confiable, de alta demanda y con poca disponibilidad a nivel nacional.

Finalmente, a la empresa se le recomienda continuar fortaleciendo sus políticas de mejora continua, estableciendo procedimientos para el monitoreo de la producción, ya sea en tiempo real o por periodos específicos ayudándose de las herramientas expuestas en este proyecto y haciendo uso de los insumos generados por el mismo.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Producción pecuaria en América Latina y el Caribe | Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <http://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/es/> (accesado Marzo 14, 2020).
- (2) Mora, S.; Valverde, M.; Mata, E. *Desempeño Del Sector Agropecuario 2018*, SEPSA, 2019.
- (3) Mora, S.; *Comercio Exterior Del Sector Agropecuario 2018-2019*; SEPSA, marzo 2020.
- (4) Navarro, D. Suplementación Mineral En Ovinos: Por Qué y Cómo?. *FONAIAP DIVULGA. Estación experimental Anzoátegui*. **1987**, No. 25.
- (5) Sánchez, R. *Estrategias En La Engorda de Ovinos. Bases de La Cría Ovina. Bases de La Cría Ovina.*; Asociación Mexicana de Técnico Especialistas en Ovinocultura: Texcoco, Mexico, 2000.
- (6) Georgievskiï, V.; Annenkov, B.; Boris N.; Samokhin, V. *Mineral Nutrition of Animals*; Butterworths, 1982.
- (7) Suttle, N. Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition. *Miner. Nutr. Livest. Fourth Ed.* **2010**, 1–547.
- (8) Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 Sobre Los Aditivos En La Alimentación Animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* **2003**, 4 (9), 24–28.
- (9) Nurarif & Kusuma; *Journal of Chemical Information and Modeling* **2013**, 53 (9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (10) Antelo, X. Efecto Del Tiempo y Procedimiento de Mezclado Del Alimento Balanceado Para Gallinas Ponedoras Sobre La Producción y Calidad Del Huevo En La Mesa. **2013**, 23.

- (11) Jiménez, B. *Aspectos de Calidad En La Producción Ovina: Carne, Canales y Pie de Cría.Tle;* Memorias del II Taller Sobre Sistemas de Producción Ovina del Noreste y Golfo de México: Tamaulipas, México, **2002**.
- (12) Council, N. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids;* The National Academies Press: Washington, DC, **2007**. <https://doi.org/10.17226/11654>.
- (13) Smith, O.; Akinbamijo, O. Micronutrients and Reproduction in Farm Animals. In *Animal Reproduction Science;* Elsevier, **2000;** Vol. 60–61, pp 549–560. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00114-7).
- (14) Vierboom, M.; Engle, T.; Kimberling, C. Effects of Gestational Status on Apparent Absorption and Retention of Copper and Zinc in Mature Angus Cows and Suffolk Ewes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **2003**, *16*. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.515>.
- (15) Oh Y.; Choi, C. Effects of Zinc on Lipogenesis of Bovine Intramuscular Adipocytes. *Asian-Australas. j. anim. sci* **2004**, v. 17 (10), 1378-1382–2004 v.17 no.10. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.1378>.
- (16) Malcolm-Callis, K.; Duff, G.; Gunter, S.; Kegley, E.; Vermeire, D. Effects of Supplemental Zinc Concentration and Source on Performance, Carcass Characteristics, and Serum Values in Finishing Beef Steers. *Journal of Animal Science* **2000**, *78* (11), 2801–2808. <https://doi.org/10.2527/2000.78112801x>.
- (17) May, J.; Contoreggi, C. The Mechanism of the Insulin-like Effects of Ionic Zinc. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257* (8), 4362–4368.
- (18) Coulston, L.; Dandona, P. Insulin-like Effect of Zinc on Adipocytes. *Diabetes* **1980**, *29* (8), 665–667. <https://doi.org/10.2337/diab.29.8.665>.
- (19) Mills, B.; Broghamer, W.; Higgins, P.; Lindeman, R. Inhibition of Tumor Growth by Zinc Depletion of Rats. *The Journal of nutrition* **1984**, *114* (4), 746–752. <https://doi.org/10.1093/jn/114.4.746>.
- (20) Fong, L.; Farber, J.; Magee, P. Zinc Replenishment Reduces Esophageal Cell Proliferation and N-Nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-Induced Esophageal Tumor Incidence in Zinc-Deficient Rats. *Carcinogenesis* **1998**, *19* (9), 1591–1596. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.9.1591>. (21)
- (21) Barch, D.; Iannaccone, P. Role of Zinc Deficiency in Carcinogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1986**, *206*, 517–527. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1835-4_36.
- (22) Yamaji, S.; Tennant, J.; Tandy, S.; Williams, M.; Singh, S.; Sharp, P. Zinc Regulates the Function and Expression of the Iron Transporters DMT1 and IREG1 in Human Intestinal Caco-2 Cells. *FEBS letters* **2001**, *507* (2), 137–141. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02953-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02953-2).

- (23) Leong, W.; Bowlus, C.; Tallkvist, J.; Lönnerdal, B. DMT1 and FPN1 Expression during Infancy: Developmental Regulation of Iron Absorption. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **2003**, 285 (6 48-6), G1153-61. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00107.2003>.
- (24) Shimada M. (2009), Nutrición animal, 2da edición, Trillas, México.
- (25) Park, K.; Lee, N.; Lee, K.; Seo, J.; Choi, K. The ERK Pathway Involves Positive and Negative Regulations of HT-29 Colorectal Cancer Cell Growth by Extracellular Zinc. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2003**, 285 (6), G1181–G1188. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00047.2003>.
- (26) Brown, K.; Rivera, J.; Bhutta, Z.; Gibson, R.; King, J.; Lönnerdal, B.; Ruel, M.; Sandtröm, B.; Wasantwisut, E.; Hotz, C. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) Technical Document #1. Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for Its Control. *Food and nutrition bulletin* **2004**, 25 (1 Suppl 2), S99-203.
- (27) Mostafa, W.; Al-Zayer, A. Acrodermatitis Enteropathica in Saudi Arabia. *International Journal of Dermatology* **1990**, 29 (2), 134–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1990.tb04086.x>.
- (28) Lyons T., Jacques K., (2004), Nutritional Biotechnology in the feed and Food Industries proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium, 1era edición, Nottingham University Press, Reino Unido.
- (29) Hendy, H.; Yousef, M.; Naga, N. Effect of Dietary Zinc Deficiency on Hematological and Biochemical Parameters and Concentrations of Zinc, Copper, and Iron in Growing Rats. *Toxicology* **2001**, 167 (2), 163–170. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00373-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00373-0).
- (30) Johnson, T.; Graham, D. Diagnosis and Management of Iron Deficiency Anemia in the 21st Century. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. SAGE Publications **2011**, pp 177–184. <https://doi.org/10.1177/1756283X11398736>.
- (31) Baltaci, A.; Sunar, F.; Mogulkoc, R.; Toy, H. The Effect of Zinc Deficiency and Supplementation on Elements in the Kidney Tissue of Ovariectomized Rats: Histopathologic Changes. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* **2017**, 87 (3–4), 131–138. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000396>.
- (32) Kelleher, S.; Lönnerdal, B. Zinc Supplementation Reduces Iron Absorption through Age-Dependent Changes in Small Intestine Iron Transporter Expression in Suckling Rat Pups. *The Journal of nutrition* **2006**, 136 (5), 1185–1191. <https://doi.org/10.1093/jn/136.5.1185>.
- (33) Nakamura, H.; Sekiguchi, A.; Ogawa, Y.; Kawamura, T.; Akai, R.; Iwawaki, T.; Makiguchi, T.; Yokoo, S.; Ishikawa, O.; Motegi, S. Zinc Deficiency Exacerbates Pressure Ulcers by Increasing Oxidative Stress and ATP in the Skin. *Journal of Dermatological Science* **2019**, 95 (2), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.07.004>.

- (34) Van Heyst, A.; Vanlancker, M.; Vercammen, J.; Van den Houwe, K.; Mertens, B.; Elskens, M.; Van Hoeck, E. Analysis of Mineral Oil in Food: Results of a Belgian Market Survey. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2018**, *35* (10), 2062–2075. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1512758>.
- (35) Dong, X.; Xiong, Y.; Wang, N.; Song, Z.; Yang, J.; Qiu, X.; Zhu, L. Determination of Trace Elements in High-Purity Quartz Samples by ICP-OES and ICP-MS: A Normal-Pressure Digestion Pretreatment Method for Eliminating Unfavorable Substrate Si. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1110*, 11–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.006>
- (36) Buñay, J. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES PARA DETERMINAR DIGESTIBILIDAD EN ALIMENTO BALANCEADO FRENTE AL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL. Para la Obtención Del Título de : BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO Riobamba, Ecuador. **2010**.
- (37) GRAY, P.; CUNNINGHAM, W. Inductively Coupled Plasma Collision Cell Quadrupole Mass Spectrometric Determination of Extractible Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Other Elements in Food Using Microwave-Assisted Digestion: Results from an FDA Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International* **2019**, *102* (2), 590–604.
- (38) Shariff, R.; Achary, A.; Pacquette, L.; Mittal, A.; Girdhar, R. Analytical Method Validation and Determination of Iron and Phosphorus in Vegetable Oil by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry with Microwave Assisted Digestion. *Analytical Letters* **2018**, *51* (11), 1774–1788.
- (39) Schwank, T.; Pitzke, K.; Gusbeth, K.; Ashley, K.; Breuer, D. Comparison of Microwave-Assisted Digestion and Consensus Open-Vessel Digestion Procedures for Evaluation of Metalliferous Airborne Particulate Matter. *Annals of Work Exposures & Health* **2019**, *63* (8), 950–964.
- (40) Dündar, M.; Altundag, H.; Tunca, G. Determination of Boron in Hazelnut Varieties with the Addition of Sorbitol by Using ICP-OES and Ultrasonic Nebulization after Microwave Digestion System. *Journal of Chemical Metrology* **2018**, *12* (2), 113–120.
- (41) Sarikurkcu, C.; Tepe, B.; Semiz, D.; Solak, M. Evaluation of Metal Concentration and Antioxidant Activity of Three Edible Mushrooms from Mugla, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48* (5), 1230–1233. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.033>.
- (42) Leao, D.; Junior, M.; Brandao, G.; Ferreira, S. Simultaneous Determination of Cadmium, Iron and Tin in Canned Foods Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Talanta* **2016**, *153*, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.023>.
- (43) Dohnalova, L.; Bucek, P.; Vobornik, P.; Dohnal, V. Determination of Nickel in Hydrogenated Fats and Selected Chocolate Bars in Czech Republic. *Food Chemistry* **2017**, *217*, 456–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.066>.

- (44) Nóbrega, J.; Donati, G. Microwave-Assisted Sample Preparation for Spectrochemistry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2011**. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9185>.
- (45) Bendicho, C.; Lavilla, I.; Pena-Pereira, F.; Romero, V. Green Chemistry in Analytical Atomic Spectrometry: A Review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2012**, 27 (11), 1831–1857. <https://doi.org/10.1039/c2ja30214d>.
- (46) Araújo, G.; Gonzalez, M.; Ferreira, A.; Nogueira, A.; Nóbrega, J. Effect of Acid Concentration on Closed-Vessel Microwave-Assisted Digestion of Plant Materials. In *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*; **2002**; Vol. 57, pp 2121–2132. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00164-7).
- (47) Bizzi, C.; Flores, E.; Barin, J.; Garcia, E.; Nóbrega, J. Understanding the Process of Microwave-Assisted Digestion Combining Diluted Nitric Acid and Oxygen as Auxiliary Reagent. *Microchemical Journal* **2011**, 99 (2), 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.05.002>.
- (48) Mizuike, A.; Boschke, F.; Fresenius, W.; Huber, J.; Pungor, E.; Rechnitz, G.; Simon, W.; West, S., Springer, V. *Enrichment Techniques for Inorganic Trace Analysis*, eds **1983**, pp. 9-20
- (49) Díaz, R. Ventajas y Desventajas Del Análisis Por ICP – MS de Metales Pesados En Muestras Biológicas. *BOLETÍN INSTITUCIONAL Bol Inst Nac Salud* **2017**, 23 (8), 54–63.
- (50) Lorena, A.; Miguel, J.; *Análisis multielemental de material foliar por medio de ICP-MS*, San José, Costa Rica. Disponible En: <Http://Www.Redalyc.Org/Articulo.Oa?Id=43629103>. **2005**.
- (51) Loon, V.; *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy*. Elsevier Science. Retrieved from <https://www.perlego.com/book/1874010/analytical-atomic-absorption-spectroscopy-pdf> (Original work published **2012**)
- (52) Robinson, J. Atomic Absorption Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **1960**, 32 (8), 17A-29A. <https://doi.org/10.1021/ac60164a712>.
- (53) Menzies, A. A Study of Atomic Absorption Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **1960**, 32 (8), 898–904. <https://doi.org/10.1021/ac60164a001>.
- (54) Skoog, D., Holler, F. y Nieman, T. **2001**. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill/Interamericana de España, S.A.U,9 edición
- (55) Smith, J.; Butrimovitz, G.; Purdy, W. Direct Measurement of Zinc in Plasma by Atomic Absorption Spectroscopy. *Clinical Chemistry* **1979**, 25 (8), 1487–1491. <https://doi.org/10.1093/clinchem/25.8.1487>.
- (56) David, D. Determination of Zinc and Other Elements in Plants by Atomic-Absorption Spectroscopy. *The Analyst* **1958**, 83 (993), 655–661. <https://doi.org/10.1039/AN9588300655>.

- (57) *PS15 Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories (ISO 17025) PS15.*
- (58) *ISO/IEC 17025 - General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories;2005.*
- (59) LSP, L. de S. P. del M. Guia Para La Validación de Métodos de Ensayo. **2015**, 1–26.
- (60) Barwick, L.;Morillas, P.;Ellison, S.; Gjengedal, E. *Guía Eurachem La Adecuación al Uso de Los Métodos Analíticos Primera Edición;2016, Española Agradecimientos Grupo Del Proyecto.*
- (61) AOAC (2000). Official Method. Official Methods of Analysis, vol. 2, 17th ed.
- (62) Picheansoonthon, C.; Engle, J.; Doskotch, R. *Conformational Studies of 11(S)-Dihydrospiciformin; 1990; Vol. 56.* <https://doi.org/10.1055/s-2006-961117>.
- (63) Dodge, Yadolah (2003). The Oxford Dictionary of Statistical Terms. Oxford University Press. ISBN 0-19-920613-9.
- (64) Montgomery, D. C., 2009, *Introduction to Statistical Quality Control*, Arizona: John Wiley and Sons, Inc.
- (65) Bland, J.M.; Altman, D.G. (1996).; Statistics notes: measurement error. *BMJ* 312 (7047):1654. PMC 2351401. PMID 8664723. doi:10.1136/bmj.312.7047.1654.
- (66) Política de Validación de Métodos; ECA, **2014**.
- (67) FAO/OMS, 1995. *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento.* (Novena edición). FAO, Roma.
- (68) Limeres, M. Regresión Lineal Simple 1. **2012**, 1–31.
- (69) Mendoza, H.; Vargas, J.; López, L. y Bautista, G. (2002). Métodos de regresión. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2007315/>
- (70) Karageorgou, E.; Samanidou, V. Youden Test Application in Robustness Assays during Method Validation. *J. Chromatogr*, **2014**, 1353, 131–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>
- (71) PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMITÉ DEL CODEX SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRAS, **2009**, Hungría.
- (72) CODEX ALIMENTARIUS. Directrices Generales Sobre Muestreo CAC/GI 50. **2004**, No. CI, 73.
- (73) Guerra MA, Carrillo MMG. Conceptos básicos y premisas para calcular el tamaño de muestra. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2006;44(Suppl: 2):67-70.

- (74) Carro, R., & González Gómez, D. A. (2012). *Control estadístico de procesos*. <http://nulan.mdp.edu.ar/1617/>
- (75) Alvarado, H., & Batanero, C. (2008). Significado del teorema central del límite en textos Universitarios de probabilidad y estadística. *Estudios Pedagógicos (Valdivia)*, 34(2), 7–28. <https://doi.org/10.4067/S0718-07052008000200001>
- (76) Feinberg, M., Boulanger, B., Dewé, W., & Hubert, P. (2004). New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(3), 502–514. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2791-y>
- (77) Mosquera-Artamonov, J. D., Artamonova, I., & Mosquera, J. C. (2014). Diagnóstico del proceso de inspección mediante índices de capacidad. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 22(1), 53–61. <https://doi.org/10.4067/S0718-33052014000100006>
- (78) *Process Capability and Non-Normal Data | BPI Consulting*. (n.d.). Retrieved October 13, 2020, from https://www.spcforexcel.com/knowledge/process-capability/process-capability-and-non-normal-data#correct_approach_Ppk
- (79) MONTGOMERY, Douglas. Control estadístico de la calidad. Tercera edición, Grupo editorial LIMUSA S.A., México 2004
- (80) *Interpretar los resultados clave para Análisis de capacidad Seis en uno de subgrupos/corto plazo - Minitab*. (n.d.). Retrieved October 14, 2020, from <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/capability-analysis/how-to/capability-sixpack/between-within-capability-sixpack/interpret-the-results/key-results/>
- (81) DANIEL W. (2004). Estadística descriptiva. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. Ciudad de México: Editorial: LIMUSA, 15-56.
- (82) Andrea, J., García, M., & Uribe, I. A. (2013). *Técnicas para detección de outliers multivariantes*, Vol. 3, Issue 5, <https://41Ea4B9ajF7dnAdksUdXr24HjonuVHUp9w1FpcEZg99>
- (83) Kwak, S. K., & Kim, J. H. (2017). Statistical data preparation: management of missing values and outliers. *Korean J Anesthesiol*, 1st, 407–411. <https://doi.org/10.4097/kjae.2017.70.4.407>
- (84) Wong, J., Hao, C., Zhang, K., Yang, P., Banerjee, K., Hayward, D., Iftakhar, I., Schreiber, A., Tech, K., Sack, C., Smoker, M., Chen, X., Utture, S. C., & Oulkar, D. P. (2010). Development and Interlaboratory Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Multiresidue Pesticide Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5897–5903. <https://doi.org/10.1021/jf903849n>
- (85) Científico, A., Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F., & Hernández, G. (2009). *Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario* (Vol. 4, Issue 2). www.saber.ula.ve/avancesenquimica

- (86) W. J. Youden, E. H. Steiner, *Statistical Manual of the AOAC*, AOAC International, 1975, ISBN 0-935584-15-3.
- (87) O. A. Quatrochi, S. I. Abelaira, R. F. Laba, *Introducción a la HPLC, teoría y práctica*, Buenos Aires, 1992.
- (88) W. J. Youden, The Collaborative Test, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 195 (1990).
- (89) Y. Vander y col., *Guidance for Robustness/Ruggedness*, Universidad de Bruselas, Bélgica, 2003.
- (90) Benesty, J., Chen, J., Huang, Y., & Cohen, I. (2009). Pearson correlation coefficient. In *Springer Topics in Signal Processing* (Vol. 2, pp. 1–4). Springer Science and Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00296-0_5
- (91) Privitera, G. J. (2017). *Statistics for the Behavioral Sciences*. SAGE Publications.
- (92) Weisberg, W. (2005). *Applied Linear Regression - Sanford Weisberg -*. WILEY publishers.
- (93) Miller, N.J. y Miller, C.J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Editorial Prentice Hall, 4ª Edición.
- (94) Aseguramiento de calidad en sistemas de suministro farmacéutico. En: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Twenty seventh report. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1980, Anexo 1 (Serie de Informes técnicos OMS, N° 645).
- (95) Validación de procedimientos analíticos usados en el examen de materiales farmacéuticos. En: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1992, Anexo 5 (Serie de informes técnicos OMS, N° 823).
- (96) Quino, Israel, Ramos, Oswaldo, & Guisbert, Elvira. (2007). DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION INSTRUMENTAL (LDI) Y LIMITE DE CUANTIFICACION INSTRUMENTAL (LCI) EN ELEMENTOS TRAZA DE AGUA SUBTERRANEA. *Revista Boliviana de Química*, 24(1), 53-57. Recuperado en 18 de abril de 2022, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602007000100010&lng=es&tlng=es
- (97) Cádiz-Carrasco, M., & García Alegría, A. (2015). VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE. *BIOtecnia*, 17, 32. <https://doi.org/10.18633/bt.v17i1.15>
- (98) Alvarado, A. L.; Yglesias, J. M. y Güell, O. (2005). Análisis multielemental de material foliar por medio de ICP-MS. *Agronomía Costarricense*. 29(1), 17-27.
- (99) Rodríguez Rodríguez, A. C., Mosquera Sierra, J., Luna Saucedo, B., Martín Chávez, L., & Zaldívar Subirat, M. (2005). Validación de un método de determinación de Na, K, Cd, Pb y

Hg por Espectrometría de Absorción Atómica en policosanol y extracto purificado de cera de caña. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 36(1), 9–14. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181620586003>

- (100) CENAM- ema. (2009). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México, D.F.
- (101) IUPAC. (2014). Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, *Pure and Appl. Chem.* vol. 71:337-348.
- (102) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (2001). Selectivity in analytical chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, 73(8). 1381-1386.
- (103) Compañó, R. y Ríos, A. (2002). Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Madrid: Editorial Síntesis.
- (104) Suárez, R. et al.(2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química*, 4(2), 53-62.
- (105) UNODC. (2010). Por una calidad y perfeccionamiento continuo. 69. https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf?fbclid=IwAR3IIYZJRWgHNgrmgWBzd63n1XQAio96gn2fXvqwB3K8t3h8ppBs3c3BNtU
- (106) Pérez López, E., Carlina, D., & Rodríguez, A. (2018). *Cuantificación por absorción atómica de Cu, Fe y Zn en alcohol destilado y agua*. 10(2), 387–396.
- (107) Correa, J. C., Iral, R., & Rojas, L. (2006). Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. *Revista colombiana de estadística*, 29(1), 57-76.
- (108) Ramírez, C., Olarte, E., Tellez, E., & Palma, M. (2013). Validación del método analítico para la determinación de mercurio total en sangre humana por Espectrofotometría de absorción atómica Zeeman RA-915+ con el módulo de pirolisis Pyro-915+. *Revista Colombiana de Química*, 42(3), 1–18.
- (109) Bader, M. (1980). A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *Journal of Chemical Education*, 57(10), 703.
- (110) Universitat de Barcelona. Institut de Ciències de l'Educació. Secció de Recerca., V., & Rubio Hurtado, M. J. (2008). *REIRE revista d'innovació i recerca en educació*. Secció de Recerca de l'Institut de Ciències de l'Educació de la Universitat de Barcelona.
- (111) Terrés-Speziale AM. Estimación de la incertidumbre y de la variabilidad total en el laboratorio clínico. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 2006;53(4):185-196.
- (112) Sistemas de Gestión de la Calidad – Fundamentos y vocabulario. NMX-CC-9000 IMNC-2000, Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C., 2001, México, D.F
- (113) Cabrera, H. R., León, A. M., Medina, D. N., & Chaviano, Q. N. (2015). Revisión del estado del arte para la gestión y mejora de los procesos empresariales. *Enfoque UTE*, 6(4), 1-22.

- (114) Chaparro, E. A., & Vargas, J. A. (2000). Gráficos de control para la media de un proceso en poblaciones con distribución asimétrica. *Revista Colombiana de Estadística*, 23(2), 29-44.
- (115) Losada, L. L. (2000). Análisis de Capacidad del Proceso para Datos con Distribución No-Normal. *Memorias del XIII Foro Nacional de Estadísticas. ITESM, Campus Monterrey. Monterrey, NL 5 al 9 de Octubre de 1998*, 87.

CAPÍTULO VI. ANEXOS

Anexo 1. Diseño experimental de Youden-Steiner para el análisis de metales en premezclas.

| Variable modificada | Repetición | | | | | | | |
|---|------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Procesamiento de la muestra A = homogenizar A = No homogenizar | A | A | A | A | a | a | a | a |
| Cantidad de Ácido Nítrico B = 10 ml b = 5ml | B | B | B | b | B | b | b | b |
| Cambio de Coayudante C = 2 ml HCl C = 2 ml de H ₂ O ₂ (30%) | C | c | C | c | C | c | C | c |
| Sin Coayudante D = 2ml de HCl d = sin HCl | D | D | d | d | d | d | D | D |
| Calidad de agua de dilución E = Agua tipo I d e = Agua tipo II | E | e | E | e | e | E | e | E |
| Masa de muestra F= 0,5 g f = 0,25 g | F | f | f | F | F | f | f | F |
| Enfriamiento posterior a la digestión G= 20 min g = Sin espera | G | g | g | G | g | G | G | g |

Anexo 2. Base de datos utilizada para el análisis retrospectivo correspondiente a años 2018-2019.

Accesible en: shorturl.at/lquwZ

Anexo 3. Resumen de datos descriptivos con respecto a desempeño para el conjunto de datos estudiado.

| Parámetro | Media (%) | Desviación estándar (%) | Máximo (%) | Mínimo (%) | Numero de muestras |
|-----------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| Total | 103.8 | 20.7 | 215.3 | 69.2 | 109 |
| Mn | 101.7 | 15.7 | 156.9 | 69.2 | 42 |
| Zn | 105.0 | 23.3 | 215.3 | 78.5 | 67 |
| Total por matriz | | | | | |
| Aves | 101.2 | 15.8 | 147.5 | 69.2 | 44 |
| Bovino | 111.8 | 30.9 | 215.3 | 81.6 | 25 |
| Porcino | 103.1 | 18.6 | 188.0 | 85.4 | 26 |
| Otras especies | 98.5 | 10.3 | 112.9 | 80.1 | 14 |
| Zinc por matriz | | | | | |
| Aves | 103.3 | 19.7 | 147.5 | 78.5 | 14 |
| Bovino | 117.8 | 38.5 | 215.3 | 93.8 | 13 |
| Porcino | 103.1 | 18.6 | 188.0 | 85.4 | 26 |
| Otras especies | 98.5 | 10.3 | 112.9 | 80.1 | 14 |
| Manganeso por matriz | | | | | |
| Aves | 100.3 | 13.9 | 135.0 | 69.2 | 30 |
| Bovino | 105.2 | 19.5 | 156.9 | 81.6 | 12 |

Anexo 4. Resumen de la estadística descriptiva para el conjunto de muestras analizadas.

| Parámetro | Media (%) | Desviación estándar (%) | Máximo (%) | Mínimo (%) | Numero de muestras |
|-------------------|------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| Total | 102.8 | 11.3 | 143.8 | 70.5 | 130 |
| Mn | 102.2 | 12.8 | 143.8 | 70.5 | 65 |
| Zn | 103.3 | 9.7 | 134.8 | 83.5 | 65 |
| Por matriz | | | | | |

| | | | | | |
|-----------------------|-------|------|-------|-------|----|
| Aves | 103.1 | 13.9 | 143.8 | 70.5 | 60 |
| Bovino | 103.8 | 7.7 | 117.1 | 91.4 | 20 |
| Porcino | 100.9 | 9.5 | 117.5 | 75.9 | 10 |
| Otras especies | 106.0 | 5.5 | 113.8 | 94.7 | 40 |
| Para Zinc | | | | | |
| Aves | 104.8 | 11.0 | 134.8 | 89.3 | 30 |
| Bovino | 104.8 | 7.7 | 117.1 | 94.7 | 10 |
| Porcino | 100.1 | 8.8 | 114.5 | 83.5 | 20 |
| Otras especies | 104.1 | 6.8 | 112.9 | 94.7 | 5 |
| Para Manganeso | | | | | |
| Aves | 101.3 | 16.3 | 143.7 | 70.5 | 30 |
| Bovino | 102.8 | 7.9 | 114.6 | 91.4 | 10 |
| Porcino | 101.8 | 10.3 | 117.5 | 75.9 | 20 |
| Otras especies | 107.9 | 3.7 | 113.8 | 104.8 | 5 |

Anexo 5. Estadística descriptiva de los controles de masa y lectura.

| Analito | Manganeso | | Zinc | |
|----------------------------|------------------|----------------|-------------|----------------|
| | Masa | Lectura | Masa | Lectura |
| Promedio (%) | 95.22 | 99.74 | 98.57 | 102.21 |
| Desviación Estándar | 3.37 | 6.05 | 3.44 | 5.19 |
| Máximo | 99.93 | 106.41 | 104.32 | 106.96 |
| Mínimo | 90.94 | 90.26 | 92.63 | 91.74 |
| N | 12 | 10 | 11 | 11 |

Anexo 6. Estadística descriptiva de los controles de matriz fortificada.

| Analito | Manganeso | Zinc |
|----------------------------|------------------|-------------|
| Promedio (%) | 101.82 | 101.76 |
| Desviación Estándar | 4.32 | 3.85 |
| Máximo | 106.69 | 106.76 |
| Mínimo | 96.02 | 95.99 |

| | | |
|---|---|---|
| N | 9 | 8 |
|---|---|---|

Anexo 7. Resultados de las pruebas de repetibilidad.

| Analista | JRA | | KVHU | | VRS | |
|------------------------------------|------------|--------|-------------|--------|------------|--------|
| Analito | Mn | Zn | Mn | Zn | Mn | Zn |
| Promedio (mg/kg) | 53533.35 | 593.28 | 53992.04 | 630.76 | 54318.89 | 622.13 |
| Desviación estándar (mg/kg) | 420.17 | 45.50 | 860.48 | 46.01 | 672.00 | 32.75 |
| % Cv | 0.78 | 7.67 | 1.59 | 7.29 | 1.24 | 5.26 |

Anexo 8. Informe correspondiente al análisis retrospectivo presentado a la empresa productora.

Accesible en: shorturl.at/ajX09

Anexo 9. Presentación visual expuesta a la empresa productora.

Accesible en: shorturl.at/cfho7

Anexo 10. Base de datos utilizada para la validación del método analítico, datos para manganeso.

Accesible en: shorturl.at/dioQ5

Anexo 11. Base de datos utilizada para la validación del método analítico, datos para zinc

Accesible en: shorturl.at/hJTY0

Anexo 12. Documento resumido de las pruebas estadísticas realizado a la data de manganeso.

Accesible en: shorturl.at/djlou

Anexo 13. Documento resumido de las pruebas estadísticas realizado a la data de zinc.

Accesible en: shorturl.at/dfik5

Anexo 14. Informe de validación del método analítico para la determinación de zinc y manganeso en premezclas alimenticias animales mediante absorción atómica.

Accesible en: shorturl.at/cijk2

Anexo 15. Base de datos de las muestras analizadas durante 3 meses del año 2021.

Accesible en: shorturl.at/oQW17

Anexo 16. Resumen de las pruebas estadísticas realizadas con las muestras analizadas.

Accesible en: shorturl.at/aiKT1