

UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ANÁLISIS BROMATOLÓGICO INTER-LABORATORIO DE HARINA DE
CENTENO A SER UTILIZADO COMO PATRÓN SECUNDARIO DE
ANÁLISIS”**

Trabajo de investigación previa a la obtención del
Título de Bioquímico Farmacéutico

AUTORES: JORGE OMAR CABRERA MEDINA

C.I. 0104251848

JESSICA VALERIA PERALTA HERRERA

C.I. 0105215081

DIRECTORA: DRA.SILVIA JOHANA ORTIZ ULLOA, PhD.

C.I. 0301082897

ASESORAS: BIOQ. FARM. GABRIELA CRISTINA ASTUDILLO RUBIO

C.I. 0104149828

BIOQ. FARM. JESSICA ANDREA LEÓN VIZÑAY, MSc.

C.I. 0104848098

CUENCA- ECUADOR

2016



RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue realizar un estudio inter-laboratorio bromatológico a partir de un patrón secundario de harina de centeno. Los laboratorios participantes de este estudio comparativo fueron el Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Universidad de Cuenca y el Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias. Los parámetros del análisis fueron: humedad, materia seca, cenizas, proteína bruta total, grasa total y carbohidratos totales. También el contenido de sal (cloruros) se analizó en uno de los laboratorios. Para los análisis de los diferentes parámetros se utilizaron las metodologías establecidas en cada laboratorio. Con los datos generados se realizaron gráficas de control Levey-Jennings para cada parámetro y laboratorio para el posterior control de análisis utilizando el patrón secundario dentro de los dos laboratorios participantes. Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante pruebas T de Student de una cola utilizando un nivel de significancia del 5%. Además se determinó la precisión intra- e inter-día siguiendo el método ANOVA y se expresó como porcentaje de coeficiente de variación (% CV). Todos los análisis fueron realizados en los programas Microsoft Excel 2013 y STATA 10.0. Para ambos laboratorios, los coeficientes de variación inter- e intra-día no sobrepasaron el 15%, que es lo recomendado para análisis proximal. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en los análisis de grasas, humedad-materia seca y carbohidratos, que pueden atribuirse a las diferencias metodológicas, temperatura y equipos de análisis, y en menor grado a los analistas y al azar.

Palabras clave: Estudio inter-laboratorio, patrón secundario, harina de centeno, gráficas control.



ABSTRACT

The objective of this research was to perform an inter-laboratory study using a secondary standard of rye flour for food analysis. The participating laboratories in this comparative study were the Laboratory of Food Analysis for public service of the Cuenca University and the Laboratory of Food and Nutrition (VLIR-IUC) of the Department of Biosciences of Cuenca University. The analytical parameters were: humidity, dry matter, ash, total protein, total fat and total carbohydrates. Also, salt content (chlorides) was determined in one of the laboratories. For the analysis of the different parameters, the established methodologies in each laboratory were utilized. With the generated data, Levey-Jennings control charts were made for each parameter and laboratory for further control using the secondary standard in both of the participating laboratories. The results were statistically evaluated by means of one tailed T Student tests with a significance level of 5%. Also, intra (within) - and inter (between)-day precision were determined following the ANOVA method and were expressed as coefficient of variation in percentage (%CV). All the statistical analyses were executed in the Microsoft Excel and STATA 10.0 programs. For both laboratories, the intra- and inter- day coefficients of variation did not surpass 15%, which is the recommended value for proximate analysis. On the other hand, significant differences were found in the analysis of fat, humidity-dry matter and carbohydrates, which can be attributed to the differences in the methodologies, temperature and analysis equipment, and in a minor degree to the personnel of analysis and random error.

Key words: Inter-laboratory study, secondary standard, rye flour, control charts.

**ÍNDICE GENERAL**

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
CLAUSULAS DE DERECHOS DE AUTOR	VI
CLAUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL	VIII
DEDICATORIA	X
AGRADECIMIENTOS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 METROLOGÍA.....	1
1.1.1 Categorías de metrología	2
1.1.2 Metrología en la investigación	2
1.2 SUSTANCIAS PATRÓN	3
1.2.1 Patrones primarios	3
1.2.2 Patrones secundarios	4
1.3 PRECISIÓN Y EXACTITUD	4
1.3.1 Precisión Intra- e Inter-día	6
1.3.2 Pruebas Inter-laboratorio y Reproducibilidad	7
1.4 DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN	7
1.4.1 Desviación Estándar.	7
1.4.2 Coeficiente de variación.	8
1.5 ERRORES ANALÍTICOS	9
1.5.1 Errores aleatorios	10
1.5.2 Error sistemático	10
1.6 GRÁFICOS DE CONTROL DE CALIDAD	11
1.6.1 Gráfica de control Levey-Jennings	12
1.7 REGLAS WESTGARD	13
1.7.1 Regla 12s	14
1.7.2 Regla 1_{3S}	15
1.7.3 Regla 2_{2S}	15
1.7.4 Regla R_{4S}	16
1.7.5 Regla 4_{1S}	17
1.7.6 Regla 10\bar{c}	18
1.8 HARINA DE CENTENO COMO PATRÓN SECUNDARIO	19
1.9 ANÁLISIS PROXIMAL	21
1.9.1 Humedad	21
1.9.2 Cenizas	23
1.9.3 Carbohidratos Totales	23
1.9.4. Grasa total	24
1.9.5 Proteína bruta total	25
1.10 CONTENIDO DE SAL.....	26
2. METODOLOGÍA	28
2.1 TIPO DE ESTUDIO	28
2.2 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	28
2.3 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	28
2.3.1 Fundamentos de los parámetros analizados	29



2.3.1.1 Humedad y contenido de materia seca	29
2.3.1.1.1 Cálculos de humedad y contenido de materia seca.....	30
2.3.1.2 <i>Contenido de cenizas</i>	30
2.3.1.2.1 <i>Cálculo de contenido de cenizas</i>	30
2.3.1.3 Contenido de grasa total por el método de Weibull-Soxhlet	31
2.3.1.3.1 <i>Cálculo de contenido de grasa total</i>	31
2.3.1.4 <i>Contenido de proteína bruta total por el método de Kjeldahl</i>	31
2.3.1.4.1 <i>Cálculo de contenido de proteínas</i>	32
2.3.1.5 Contenido de sal por el método de Mohr	33
2.3.1.5.1 <i>Cálculo de contenido de sal</i>	33
2.3.2 Procedimientos analíticos	34
2.3.3 Diferencias de los procedimientos analíticos entre laboratorios	40
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1 RESULTADOS GENERALES DEL ANÁLISIS PROXIMAL	42
3.2 COMPARACIÓN INTER-LABORATORIO	44
3.3 GRÁFICAS CONTROL DE LEVEY-JENNINGS	45
3.3.1 Ejemplo de aplicación de gráfica control	51
3.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LOS ANÁLISIS	52
4. DISCUSIÓN GENERAL	53
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
5.1 CONCLUSIONES	59
5.2 RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS	61
ANEXOS.....	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química del grano de centeno.	20
Tabla 2 Cronograma del trabajo de análisis inter-laboratorio.....	29
Tabla 3 Descripción de los laboratorios de análisis	34
Tabla 4 Diferencias en las metodologías de trabajo entre laboratorios.....	41
Tabla 5 Resultados generales del análisis proximal de la harina de centeno (patrón secundario) en ambos laboratorios: de promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE), precisión intra- e inter-día (%CV)	43
Tabla 6 Comparación inter-laboratorio en base a la Prueba T de Student.....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Precisión y Exactitud Fuente: (Dandekar & Rane, 2004)	5
Figura 2 Representación de dispersión de datos en la campana de Gauss. Fuente: (Dandekar & Rane, 2004)	9
Figura 3 Gráfico de control Levey-Jennings.	13
Figura 4 a Reglas de Westgard Regla 1_{2s}	14



Figura 4 b Reglas de Westgard. Regla 1 _{3S}	15
Figura 4 c Reglas de Westgard. Regla 2 _{2S}	16
Figura 4 d Reglas de Westgard. Regla R _{4S}	17
Figura 4 e Reglas de Westgard. Regla 4 _{1S}	18
Figura 4 f Reglas de Westgard. Regla 10X.....	19
Figura 5 a Gráfica control de humedad del laboratorio 1	45
Figura 5 b Gráfica control de humedad del laboratorio 2.....	46
Figura 5 c Gráfica control de materia seca del laboratorio 1.....	46
Figura 5 d Gráfica control de materia seca del laboratorio 2	47
Figura 5 e Gráfica control de ceniza del laboratorio 1.....	47
Figura 5 f Gráfica control de ceniza del laboratorio 2.....	48
Figura 5 g Gráfica control de grasa total del laboratorio 1	48
Figura 5 h Gráfica control de grasa total del laboratorio 2.....	49
Figura 5 i Gráfica control de proteína bruta total del laboratorio 1	49
Figura 5 j Gráfica control de proteína bruta total del laboratorio 2	50
Figura 5 k Gráfica control de contenido de sal del laboratorio 2.....	50

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Resultados individuales de análisis proximal y contenido de sal.....	67
Anexo 2 Datos recolectados durante análisis proximal y determinación de contenido de sal ..	69
Anexo 3 Ejemplificación de cálculo de coeficiente de variación intra- e inter día	73



CLAUSULAS DE DERECHOS DE AUTOR



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Jorge Omar Cabrera Medina, autor de la tesis "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO INTER-LABORATORIO DE HARINA DE CENTENO A SER UTILIZADO COMO PATRÓN SECUNDARIO DE ANÁLISIS", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 26 de Abril del 2016

Jorge Omar Cabrera Medina

C.I: 0104251848



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Jessica Valeria Peralta Herrera, autora de la tesis "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO INTER-LABORATORIO DE HARINA DE CENTENO A SER UTILIZADO COMO PATRÓN SECUNDARIO DE ANÁLISIS", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 26 de Abril del 2016

Jessica Peralta H.

Jessica Valeria Peralta Herrera

C.I: 0105215081



CLAUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Jorge Omar Cabrera Medina, autor de la tesis "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO INTER-LABORATORIO DE HARINA DE CENTENO A SER UTILIZADO COMO PATRÓN SECUNDARIO DE ANÁLISIS", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 26 de Abril de 2016

Jorge Omar Cabrera Medina

C.I: 0104251848



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Jessica Valeria Peralta Herrera, autora de la tesis "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO INTER-LABORATORIO DE HARINA DE CENTENO A SER UTILIZADO COMO PATRÓN SECUNDARIO DE ANÁLISIS", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 26 de Abril de 2016

Jessica Peralta H.

Jessica Valeria Peralta Herrera

C.I: 0105215081



DEDICATORIA

A mis padres, Jorge y Rosa, por su siempre presente aliento y fortaleza, conservando una constante conducta altruista hacia mí, siempre acompañados de consejos y lecciones de vida sustentadas desde el ejemplo propio, inculcando en mí desde temprana edad que nada viene fácil, pero que la educación es la llave que abre y abrirá puertas durante mi vida, gracias por su dedicación.

A mi hermana Ma. Augusta y mis hermanos Boris y Alex, porque sin importar las discrepancias que surgen, estas permanentemente quedan a un costado minimizadas por el intenso lazo fraternal existente y persistente entre nosotros, prevaleciendo la unión y el bien común.

A mi tío René, por ser una fuerte influencia moral, que desde su profesión ha trasladado hacia mí aquellos sentimientos de profesionalismo y dedicación además de su apoyo incondicional, siempre presto a ayudar en el aspecto que fuese.

Omar



DEDICATORIA

Sin duda alguna dedico este trabajo de investigación al pilar fundamental en mi vida, que es mi familia, a mi papi quien ha sido un ejemplo de responsabilidad y perseverancia en todo su esplendor, a mi mami que es y será mi más grande heroína, la mujer de valentía y el ejemplo más sublime de amor puro y apoyo incondicional, a mi hermano Christian, mi protector, que con sus palabras de aliento y que con su sola mirada sabía que no podía desfallecer, a mi hermano Diego, mi ejemplo a seguir y su voz diciéndome que puedo llegar aún más lejos; y como no dedicar esta tesis a la dulzura y la inocencia plasmada en mis sobrinos, Martín, Olivia y Thiago, angelitos que me alegran junto con mi familia todos los días de mi vivir. Les dedico a ustedes y a mi Dios, por ser mi motor y mi impulso diario.

Jessica



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, un agradecimiento muy sincero, lleno de cariño y gratitud, hacia la Dra. Johana Ortiz Ulloa, directora de este trabajo de investigación, por su apoyo, motivación e invaluable guía durante este trayecto que nos permite alcanzar esta tan ansiada meta profesional.

A la Dra. Diana Astudillo, por su gran acogida y predisposición, al permitirnos utilizar las instalaciones y equipos del Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Universidad de Cuenca.

A la Dra. Gabriela Astudillo Rubio, investigadora del Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias, por su colaboración y asesoría durante el desarrollo del trabajo.

A las doctoras María Montaleza y Jessica León, por la colaboración y asesoría durante el trabajo en el Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Universidad de Cuenca.

Los Autores



INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista metrológico, los laboratorios deben generar resultados analíticos absolutamente confiables, por lo que es recomendable que los profesionales del laboratorio comprendan los conceptos de trazabilidad, incertidumbre, validación y consenso para la correcta definición de los esquemas de evaluación de la calidad.

La trazabilidad metrológica es la propiedad de un resultado de medida por el cual puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de la medida. El establecimiento de la trazabilidad es fundamental para que los resultados de mediciones sean comparables a cualquier tiempo y lugar, constituyéndose en una fuerte base de apoyo a las pruebas inter-laboratorio, manteniendo una relación entre los resultados de mediciones y los valores de patrones de valor metrológico claramente definidos dentro de criterios aceptados.

Para lograr la compatibilidad de resultados a lo largo del tiempo, es importante que los resultados estén en función de una misma referencia (patrón o material de referencia certificado). Sin que signifique que los resultados sean erróneos, en la actualidad no se cuenta con dicho material de referencia y comparación para el análisis de macronutrientes en el Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del proyecto VLIR-IUC.

Los objetivos del presente estudio fueron:



Objetivo general

- Elaborar un patrón secundario de harina de centeno para análisis de macronutrientes mediante un estudio inter-laboratorio comparativo entre el Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Universidad de Cuenca y el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del proyecto VLIR-IUC del Departamento de Biociencias.

Objetivos específicos

- Analizar el contenido de macronutrientes y cloruros en la harina de centeno a ser utilizado como patrón secundario de análisis.
- Comparar el contenido de macronutrientes del patrón secundario mediante un estudio inter-laboratorio.
- Realizar las gráficas de control del patrón secundario elaborado para la validación de datos generados posteriormente mediante similares marchas analíticas.



1. MARCO TEÓRICO

1.1 Metrología

No existe una definición clara y completa de la Metrología, fuera de la clásica que la define como “ciencia de la medición” (Entidad Mexicana de Acreditación, 2013). Entre las varias definiciones de metrología, aquellas que mejor se adaptan a los fines que se persiguen en el presente trabajo están las siguientes (Bewoor & Kulkarni, 2009):

- Metrología es el campo de conocimiento concerniente con la medición e incluye tanto problemas teóricos como prácticos con referencia a la medición, cualquiera sea su nivel de exactitud y en cualquier campo de ciencia y tecnología que ocurran.
- Metrología es el control documentado de que cada equipo ha sido adecuadamente calibrado y mantenido en orden para funcionar según lo previsto y brindar resultados confiables.
- Metrología es la ciencia concerniente con el establecimiento, reproducción, conversión y transferencia de unidades de medición y sus estándares.

En general, la metrología cubre tres actividades principales (Bewoor & Kulkarni, 2009):

- 1) Definir las unidades de medición, aceptadas internacionalmente.
- 2) Establecer las unidades de medición por métodos científicos (ej. metro, kilogramo).
- 3) Establecer las cadenas de trazabilidad, al determinar y documentar el valor y exactitud de una medición y difundir ese conocimiento.



1.1.1 Categorías de metrología

La metrología está separada en tres categorías con diferentes niveles de complejidad y exactitud (Preben & Redgrave, 2008):

- *Metrología Científica*, trata con la organización y desarrollo de estándares de medición y con su mantención (nivel más alto).
- *Metrología Industrial*, asegura el adecuado funcionamiento de los instrumentos de medición utilizados en la industria, en producción y procesos de prueba, para asegurar la calidad de vida de ciudadanos y para investigaciones académicas.
- *Metrología legal*, la concierne con mediciones donde estas influyen la transparencia de transacciones económicas, particularmente donde existe un requerimiento legal para la verificación del instrumento de medición.

La metrología fundamental no posee una definición internacional, pero generalmente significa el nivel más alto de exactitud dentro de un campo dado. La metrología fundamental por lo tanto, puede ser descrita como la rama de más alto nivel de la metrología científica (Preben & Redgrave, 2008).

1.1.2 Metrología en la investigación

La metrología es esencial en la investigación científica, constituye la base de la metrología en sí (Preben & Redgrave, 2008). El conocimiento sobre su aplicación es una necesidad fundamental en la práctica de todas las profesiones con sustrato científico ya que la medición permite conocer de forma cuantitativa, las propiedades físicas y químicas de los objetos. Es así que el progreso de la ciencia siempre ha estado íntimamente ligado a los avances en la capacidad de medición. Las mediciones son un medio para



describir los fenómenos naturales en forma cuantitativa (Entidad Mexicana de Acreditación, 2013) (Especialidades en Metrología Avanzada, 2011).

1.2 Sustancias Patrón

Una sustancia patrón o estándar es una sustancia con una composición bien definida y de concentración conocida, generalmente de alta pureza, y cualquier impureza está siempre descrita en las etiqueta (The Nordic Council of Ministers, 1990).

Una sustancia patrón puede ser utilizada para determinar la cantidad y/o establecer la identidad de una sustancia de prueba (muestra) cuando mediciones de una cantidad conocida de sustancia estándar y de muestra se llevan a cabo en paralelo. Una sustancia patrón también puede ser utilizada en pruebas de recuperación, es decir para determinar la eficiencia de procesos extractivos y analíticos. Además, una sustancia patrón con una identidad diferente a la sustancia buscada, y con propiedades adecuadas en relación con la sustancia buscada y la técnica analítica usada, puede ser utilizada como un estándar interno, como se realiza por ejemplo en determinaciones cromatográficas (The Nordic Council of Ministers, 1990).

1.2.1 Patrones primarios

Un patrón primario es la sustancia con la cual es comparada una solución lo cual permite que se lleve a cabo una estandarización, sirven de calibrador primario o material de referencia primario. La calidad del patrón primario es la base para una estandarización exitosa, por lo tanto debe alcanzar ciertos requerimientos especiales que son enumerados a continuación (Kenkel, 1992):

- Debe ser 100% puro, o por lo menos su pureza debe ser conocida.



- Si es impuro, las impurezas deben ser inertes.
- Debería ser estable a temperaturas de secado en estufa.
- No debería ser higroscópico; no debería absorber agua al ser expuesto al aire del laboratorio.
- La reacción en la cual toma lugar debe ser cuantitativa y preferiblemente rápida.
- Un peso molecular alto es deseable.

1.2.2 Patrones secundarios

Se refiere a una sustancia de baja pureza (respecto a un patrón primario) cuya cantidad de concentración ha sido determinada mediante el empleo de un estándar primario o por un método analítico de confiabilidad conocida (Álvarez Calvo, 2008).

Un estándar secundario sirve el propósito de control de calidad externa para laboratorios más pequeños. Dicho estándar puede ser un químico o reactivo caracterizados por (Álvarez Calvo, 2008):

- Posee un pureza inferior a patrón primario
- Menos estable y más reactivo que un patrón primario
- Su solución permanece estable por un largo periodo de tiempo
- Se determina frente un patrón primario.

1.3 Precisión y exactitud

Metrológicamente, los términos exactitud y precisión, aunque relacionados entre sí, no deben intercambiarse ya que difieren significativamente (Dandekar & Rane, 2004).

La exactitud se refiere a la confiabilidad del método en determinar el valor considerado como verdadero del analito, es decir, muestra que tan cerca se encuentra el valor medido del valor real (Dandekar & Rane, 2004).

La precisión se refiere a la reproductibilidad de un método analítico y se expresa comúnmente como desviación estándar relativa (Dandekar & Rane, 2004).

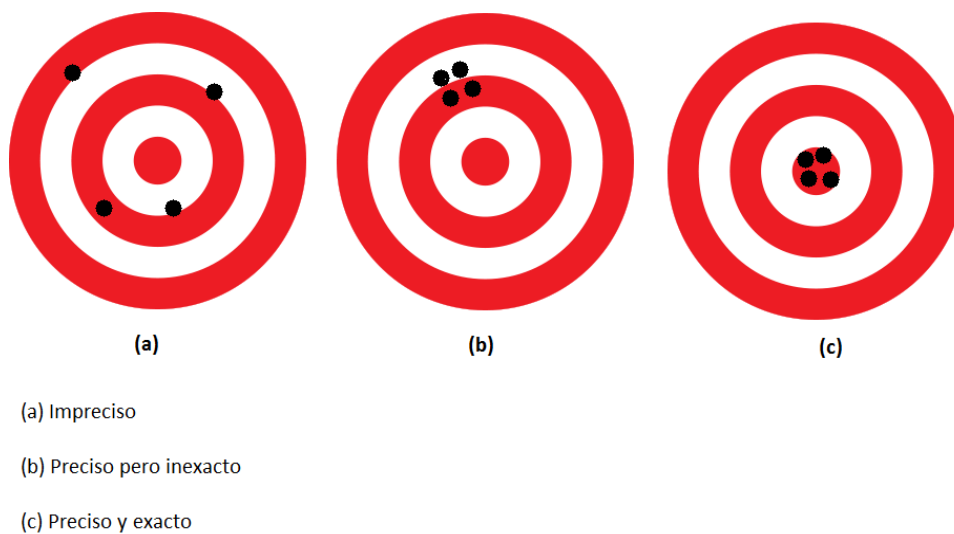


Figura 1 Precisión y Exactitud Fuente: (Dandekar & Rane, 2004)

En la figura 1, (a) representan los resultados de imprecisión, (b) representa los resultados con una buena precisión pero inexactos, donde los resultados están agrupados, pero alejados del valor real, y (c) representa los resultados con precisión y con exactitud (Dandekar & Rane, 2004).

El término *exactitud* también puede definirse como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero de la medición, englobando a la veracidad y precisión según la siguiente ecuación:

$$\text{Exactitud} = \text{Veracidad} + \text{Precisión}$$



La veracidad, definida como el grado de coincidencia o diferencia entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor aceptado como referencia, viene expresada usualmente en términos de sesgo. El sesgo representa al error sistemático total, por oposición al error aleatorio, pudiendo existir uno o más errores sistemáticos contribuyendo al sesgo. A mayor error sistemático respecto al valor aceptado como referencia, mayor sesgo, y viceversa.

Por su parte, la *precisión* se define como el grado de coincidencia existente entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad, de reproducibilidad o intermedias. Así pues, la precisión depende únicamente de la distribución de los resultados, no estando relacionada con el valor verdadero o especificado. La precisión se expresa generalmente a partir de la desviación estándar de los resultados. A mayor desviación estándar menor precisión (Entidad Mexicana de Acreditación, 2013) (Especialidades en Metrología Avanzada, 2011).

1.3.1 Precisión Intra- e Inter-día

La precisión de un método es la cercanía en concordancia entre resultados de una prueba independiente obtenidos de un material de análisis homogéneo, bajo condiciones de uso estipuladas. La variabilidad analítica entre diferentes laboratorios se define como reproducibilidad, y la variabilidad de análisis repetidos dentro de un mismo laboratorio se conoce como repetibilidad.

Se considera adecuado determinar la precisión intra- e inter-día del método analítico como parte del procedimiento de validación de un método. La precisión inter-día también puede ser referida como precisión entre-día,



mientras que la repetibilidad es definida como precisión dentro de un mismo día (intra-día) (European Medicines Agency, 2009).

1.3.2 Pruebas Inter-laboratorio y Reproducibilidad

Son conceptos que están sumamente relacionados. En una prueba inter-laboratorio, diferentes laboratorios determinan alguna característica, por ejemplo, la concentración de un analito en una o varias muestras homogéneas bajo condiciones documentadas. La reproducibilidad hace referencia a las condiciones donde los resultados de una prueba son obtenidos con el mismo método sobre idénticas muestras de estudio, en diferentes laboratorios con diferentes operadores utilizando equipos diferentes (Hund & Massart, 2000).

1.4 Desviación estándar y coeficiente de variación

1.4.1 Desviación Estándar.

La desviación estándar (DE o s) es una expresión estadística de la dispersión de los valores alrededor de un valor central promedio (media). Es representado por la siguiente fórmula:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

En donde:

Σ = Sumatoria de valores individuales

\bar{x} = Valor promedio (media)

X = Valor observado

n = Número total de valores observados



1.4.2 Coeficiente de variación.

La desviación estándar dividida para la media es referida como el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) la cual es una medida de la variación de los valores con respecto al valor promedio de la medición repetitiva.

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} \times 100$$

En donde:

DE = Desviación estándar

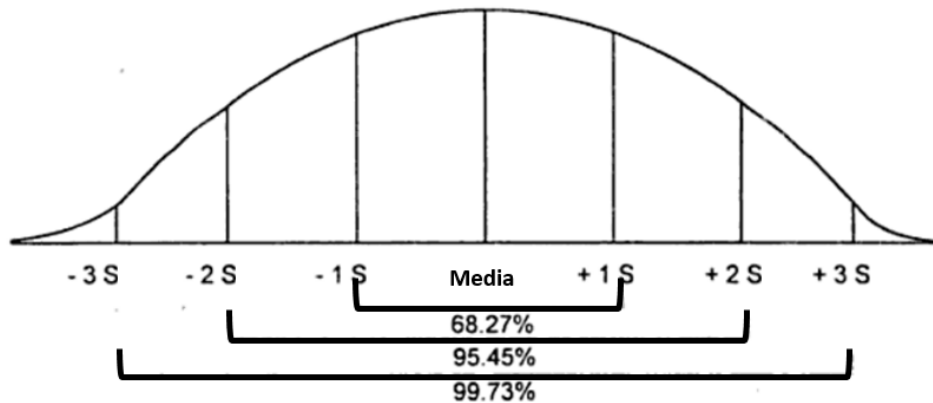
\bar{x} = Valor promedio (media)

El coeficiente de variación es una medida de dispersión que se emplea fundamentalmente para (Martínez & Gómez, 2013):

- Comparar la variabilidad entre dos grupos de datos referidos a distintos sistemas de unidades de medida.
- Comparar la variabilidad entre dos grupos de datos obtenidos por dos o más personas distintas.
- Comparar dos grupos de datos que tienen distinta media.
- Determinar si cierta media es consistente con cierta varianza.

Si se comparan dos distribuciones que utilizan las mismas unidades, sus dispersiones se pueden calcular mediante la desviación estándar siempre que sus medias aritméticas sean iguales o muy próximas. En caso contrario, se utilizará el coeficiente de variación que cuanto menor sea menor será la dispersión y, por tanto, mayor será la representatividad de la media aritmética.

La mayoría de laboratorios eligen el límite de confianza del 95% en la expresión de resultados, la media \pm DE (s) ocupa 95% del área debajo de la “curva de Gauss” para ser el límite de precisión o variación esperada. Esto se representa en la Figura 2 como el área comprendida entre -2 DE y +2 DE (Dandekar & Rane, 2004).



s, Desviación estándar

Figura 2 Representación de dispersión de datos en la campana de Gauss.

Fuente: (Dandekar & Rane, 2004)

1.5 Errores analíticos

El error se define como la diferencia entre el valor verdadero y el obtenido experimentalmente. En la química analítica, al realizar una determinación, se tropieza con varios tipos de desviación con respecto del valor verdadero, a estas desviaciones se las puede llamar incertidumbres o errores (Massart, Vandeginste, Deming, Michotte, & Kaufman, 2003).

Cuando se analizan los resultados de un experimento o determinación, es importante considerar fuentes de error y como estas afectaron a los resultados. Dos tipos principales de errores ocurren en los experimentos. Estos son *errores aleatorios* y *errores sistemáticos*.



Los errores aleatorios (indeterminados) causan mediciones imprecisas y por ende son juzgados por medio de la precisión (o imprecisión), mientras que errores sistemáticos causan resultados inexactos (incorrectos) y son referidos en términos de exactitud (o inexactitud). Si el valor verdadero es 100 y en una serie de mediciones de rendimiento los resultados son 98,101, 99 y 100, es que han ocurrido errores aleatorios. Resultados tales como 110, 108, 109 y 111 indicarían la ocurrencia de errores sistemáticos. El error total observado es la suma de los errores sistemáticos y aleatorios. Usualmente la precisión es estudiada primero, porque errores sistemáticos pueden ser determinados solo cuando los errores aleatorios son lo suficientemente pequeños y su tamaño es conocido (Massart, Vandeginste, Deming, Michotte, & Kaufman, 2003).

1.5.1 Errores aleatorios

El analista no tiene control sobre el error aleatorio. El error aleatorio involucra la variabilidad inherente en el mundo natural de hacer cualquier medición. Como su nombre implica, el error aleatorio varía de una manera aleatoria. Un esfuerzo que se hace para controlar el error aleatorio es al tomar varias mediciones, ya que los errores aleatorios poseen, en su mayoría, un valor absoluto muy pequeño y si se realiza un número suficiente de medidas se obtienen tantas desviaciones positivas como negativas (Myers, 2003) .

1.5.2 Error sistemático

El error que ocurre en la misma dirección cada vez. El error sistemático puede ser eliminado utilizando técnicas adecuadas, calibrando equipos, y utilizando estándares (Myers, 2003).



Errores sistemáticos pueden ser constantes (absolutos) o proporcionales (relativos). Un error constante se refiere a un error sistemático independiente de la concentración verdadera de la sustancia a ser determinada y es expresada en unidades de concentración. Un error proporcional es un error sistemático que depende de la concentración del analito y es expresado en unidades relativas, como el porcentaje.

Las principales fuentes de error constante son (Massart, Vandeginste, Deming, Michotte, & Kaufman, 2003):

- Selectividad insuficiente (interferencia), la cual es causada por otro componente que también reacciona de manera que se obtienen valores falsos elevados.
- Efectos matriz, lo que se debe a la presencia de un componente el cual por sí mismo no produce una lectura, pero inhibe o mejora la medición. Estas interferencias también causan una selectividad insuficiente
- Inadecuadas correcciones del blanco.

Errores proporcionales son causados por errores de calibración y, aún más particularmente, por diferentes inclinaciones de las líneas de calibración para la muestra y el estándar. La incorrecta suposición de linealidad sobre el rango de análisis también causará errores relacionados a la concertación a ser determinada (Massart, Vandeginste, Deming, Michotte, & Kaufman, 2003).

1.6 Gráficos de Control de Calidad

Un importante principio del control de calidad consiste en que los análisis de laboratorio deben ser comparados con los de otros laboratorios o con sus propios análisis previos al análisis de muestras periódicamente reservadas de



un “pool” (fuente) más amplio. Por ende los gráficos control están diseñados como medios para la comparación inter-laboratorio (Dandekar & Rane, 2004).

1.6.1 Gráfica de control Levey-Jennings

Esta gráfica es un recurso esencial para el control de calidad y es elaborado para cada determinación en un laboratorio. Los resultados control se disponen en la ordenada (eje y) versus el tiempo o serie analítica en la abscisa (eje x) (Dandekar & Rane, 2004). El desarrollo de esta gráfica exige, en primer lugar, el establecimiento de intervalos máximos entre los que puede fluctuar un resultado analítico (límites). Para ello, el material debe analizarse en series consecutivas que puede variar entre 12 y 20 repeticiones, de donde se determina el valor medio (\bar{x}) y desviación estándar (DE) para cada magnitud (Vives Corrons & Aguilar Bascompte, 2006) (Estridge, 2000). Los límites serán $\pm 1DE$, $\pm 2DE$ y $\pm 3DE$ del valor medio.

La gráfica muestra el valor medio esperado en el centro e indica los límites de control o rango de valores aceptables con líneas discontinuas (Dandekar & Rane, 2004). Cuando el procedimiento analítico muestra buena precisión y error sistemático nulo o despreciable, se espera que los valores obtenidos en el material de control se encuentren entre los límites de $\pm 2 DE$, distribuyéndose en forma normal lo que implica una distribución simétrica con una probabilidad del 95% (Fernández Espina & Mazziotta, 2005).

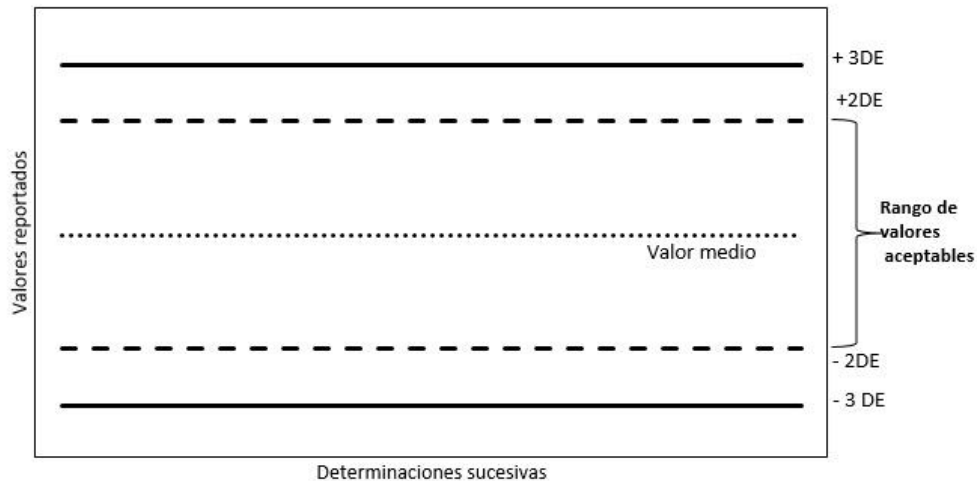


Figura 3 Gráfico de control Levey-Jennings.

Fuente: (Dandekar & Rane, 2004)

Para analistas inexpertos puede resultar difícil el interpretar los cambios sutiles en los datos control. Para resolver este problema, una serie de reglas de control pueden ser aplicadas. Esto se conoce con el nombre de “Reglas de Westgard” (Dandekar & Rane, 2004).

1.7 Reglas Westgard

En 1981, el Dr. James Westgard de la universidad de Wisconsin publicó un artículo sobre control de calidad en laboratorios, lo que estableció las bases para evaluar la calidad en las secuencias (corridas) analíticas en laboratorios médicos. Los elementos del sistema Westgard están basados en principios del proceso estadístico de control, utilizado en la industria en el país de origen (Estados Unidos) desde la década de 1950.

Existen seis reglas básicas en el esquema Westgard. Estas reglas son utilizadas individualmente o en combinación para evaluar la calidad de secuencias analíticas (Cooper G. , 2008). La mayoría de las reglas de control de calidad pueden ser expresadas como **NL** donde **N** representa el número de

observaciones control a ser evaluadas y L representa el límite estadístico para evaluar las observaciones control. Así por ejemplo, 1_{3s} representa una regla control, que es violada cuando una observación control excede los límites control ± 3 DE (Cooper G. , 2008).

1.7.1 Regla 1_{2s}

Es una regla de advertencia que es violada cuando una sola observación control se encuentra fuera de los límites ± 2 DE o s.

Esta regla advierte de un error aleatorio o un error sistemático que pudieran estar presente en el sistema de prueba. La relación del valor obtenido se debe examinar en relación con los otros controles de la misma corrida y con corridas analíticas previas. Si no se encuentra ninguna relación y si ninguna fuente de error puede ser identificada, debe asumirse que un único valor de control fuera los límites ± 2 DE es un aceptable error aleatorio. Los resultados se reportaran (Cooper G. , 2008).

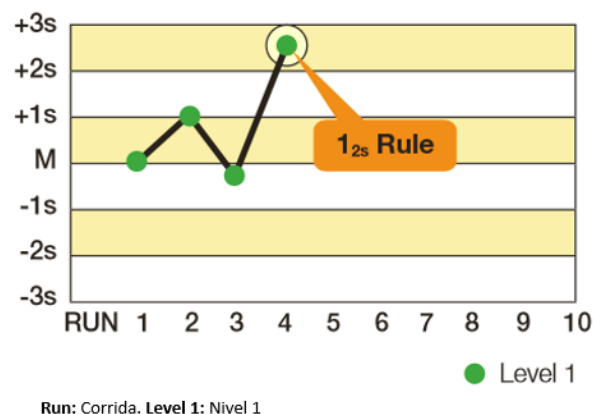


Figura 4 a Reglas de Westgard Regla 1_{2s}

Fuente: (Cooper G., 2008).

1.7.2 Regla 1_{3s}

Detecta un error aleatorio inaceptable o el inicio de un posible error sistemático. Se viola cuando el control sobrepasa el límite de ± 3 DE o s. Es una regla de rechazo (Yáñez Vera, 2009).

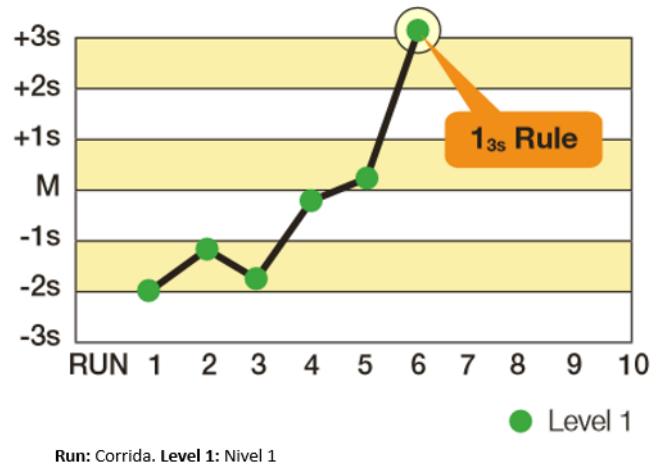


Figura 4 b Reglas de Westgard. Regla 1_{3s}

Fuente: (Cooper G., 2008).

1.7.3 Regla 2_{2s}

Esta regla identifica únicamente un error sistemático. El criterio de violación de esta regla se da cuando el error relativo en dos controles del mismo lado es superior a ± 2 DE o s. Puede tratarse de los 2 materiales incluidos en una misma serie o de un solo material que viola la regla en dos series consecutivas. Es una regla de rechazo (Cooper G. , 2008).

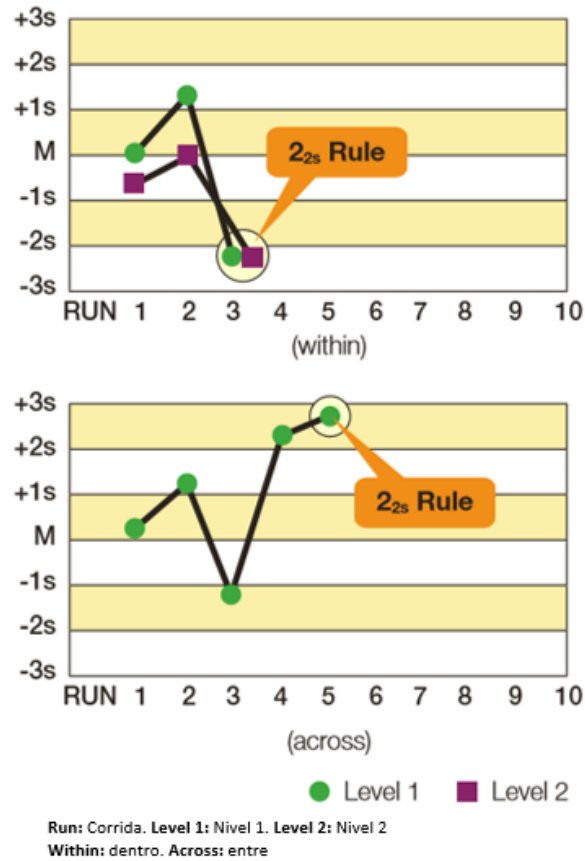


Figura 4 c Reglas de Westgard. Regla 2_{2s}

Fuente: (Cooper G., 2008).

1.7.4 Regla R_{4s}

Se viola cuando la diferencia entre dos controles excede 4 DE o s (una sola corrida) o cuando un solo material control viola la regla en 2 series consecutivas (entre corridas). Es una regla de rechazo (Yáñez Vera, 2009).

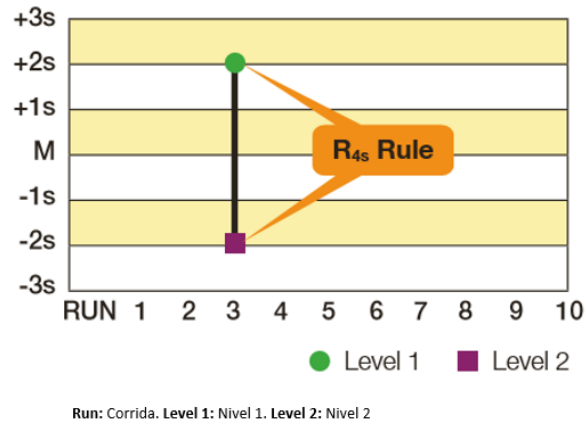


Figura 4 d Reglas de Westgard. Regla R_{4s}

Fuente: (Cooper G., 2008).

1.7.5 Regla 4_{1s}

La regla se viola cuando 4 mediciones consecutivas del control exceden la media más 1 DE o 4 mediciones consecutivas del control exceden la media menos 1 DE. Es una regla de rechazo (Yáñez Vera, 2009).

Puede ser en 4 mediciones consecutivas del control dentro de un mismo nivel o entre diferentes niveles.

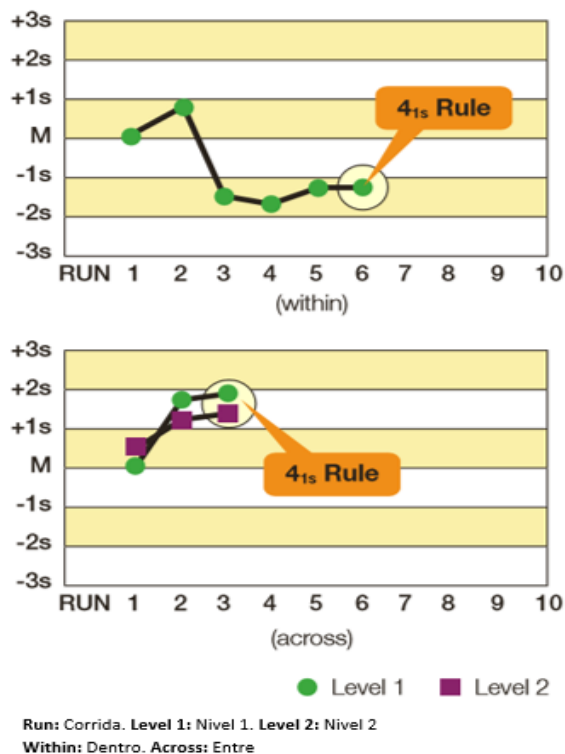




Figura 4 e Reglas de Westgard. Regla 4_{1s}

Fuente: (Cooper G., 2008).

1.7.6 Regla $10\bar{x}$

Esta regla detecta el error sistemático y se aplica tanto a los controles de intra e inter ensayo.

- La regla es violada de controles inter ensayo cuando los últimos 10 valores consecutivos, sin importar el nivel, están en el mismo lado de la media.
- La regla es violada con los controles intra ensayo cuando los 10 últimos valores del mismo nivel de control están todos en el mismo lado de la media.

Esta regla puede modificarse a 9 réplicas cuando se corren tres niveles de control, u 8 réplicas cuando se corren 4 niveles de control. Esta regla no requiere de rechazo de la corrida. Pero puede ser un indicador para realizar el mantenimiento del instrumento o calibración del instrumento/equipo (Cooper W. G., 1997).

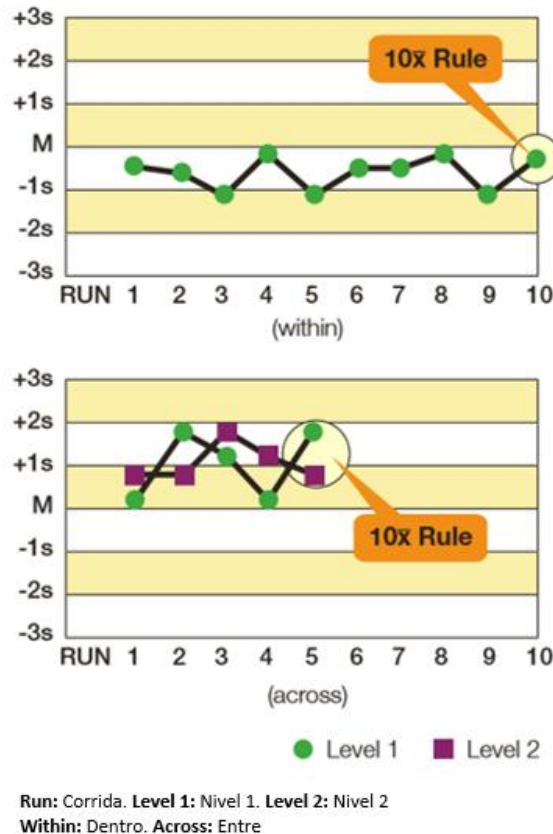


Figura 4 f Reglas de Westgard. Regla $10\bar{x}$

Fuente: (Cooper G. , 2008)

1.8 Harina de centeno como patrón secundario

El centeno es una planta monocotiledónea anual de la familia Poaceae (Gramineae). La única especie cultivada es *Secale cereale* L. Como en otros cereales, el grano de centeno está compuesto por el pericarpio, una capa de células de aleurona, el endosperma y el germen o embrión. Su color puede variar de gris verdoso a gris amarillento (Mellado, Matus, & Madariaga, 2008). El grano de centeno posee la siguiente composición química promedio (Tabla 1):



Composición del Centeno	%
Humedad	10.5
Proteínas	13.4
Grasa	1.8
Ceniza	1.9
Hidratos de carbono	74.8
Fibra dietética soluble	2.2
Sodio	2

Tabla 1 Composición química del grano de centeno.

Fuente: (Mellado, Matus, & Madariaga, 2008).

El contenido de humedad y el contenido de grasa tienen una gran importancia desde el punto de vista de estabilidad. El contenido de grasa de centeno puede considerarse bajo (1.8%) comparado con otros granos como el trigo (2.1%), por lo que resulta poco propenso a la rancidez lipídica (Mellado, Matus, & Madariaga, 2008). En cuanto al contenido acuoso, el valor porcentual de humedad libre de un alimento solo brinda una orientación para juzgar las posibilidades de crecimiento y multiplicación de los hongos. En particular, la harina de centeno suele presentar un bajo porcentaje de humedad (10.5%), por lo tanto también presentará una relativa estabilidad microbiológica pues esta se acelera a valores de humedad superiores al 13% (Gimeno, 2002). Estas condiciones permitirían utilizar esta harina como un patrón de referencia (secundario) estable a mediano plazo para el control de diferentes parámetros.



1.9 Análisis Proximal

El Análisis proximal se refiere al protocolo que comprende un conjunto de determinaciones que se realizan para conocer la composición de los alimentos y comprende la determinación analítica del agua (humedad), las cenizas, las grasas brutas (extracción con éter), las proteínas brutas, la fibra bruta y el extracto libre de nitrógeno, que representa más o menos los azúcares y almidones, y se calcula por diferencia (Greenfield & Southgate, 2006).

El sistema proximal fue diseñado para el análisis ordinario de los piensos en la estación experimental de Weende, en Alemania (Henneberg y Stohmann, 1860-1864). Su propósito de creación era obtener una clasificación extensa y con un nivel máximo de los componentes de alimentos (Greenfield & Southgate, 2006).

Los métodos analíticos que se utilizan en los diferentes procesos para el análisis proximal de alimentos deben ser apropiados, utilizar técnicas analíticas exactas y ser realizados por analistas entrenados. La selección de un método analítico debe realizarse cuidadosamente, ya que la calidad de los resultados depende de la calidad de las diferentes etapas del proceso analítico (Vinagre, 2007). A continuación se presentan ciertas particularidades en los análisis que podrían representar fuentes de errores analíticos.

1.9.1 Humedad

Todos los alimentos contienen agua, en mayor o menor proporción, en dos formas: agua libre y agua ligada. El agua libre es la forma predominante, se libera con facilidad por evaporación o por secado. El agua ligada está



combinada o unida en alguna forma química a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y adsorbida en la superficie de las partículas coloidales (García & Fernández, 2012).

Los métodos de secados, son los métodos de elección para valorar el contenido de humedad en los diferentes alimentos. En dichos métodos se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Si bien estos métodos brindan buenos resultados que pueden ser interpretados sobre bases de comparación, es importante tener en consideración (García & Fernández, 2012):

- En ciertos casos es difícil eliminar por secado toda la humedad presente.
- Existe susceptibilidad del alimento a descomponerse, a cierta temperatura, lo cual da lugar a la volatilización de otras sustancias además del agua
- También pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua.
- Los métodos de deshidratación en estufa son inadecuados para productos, como las especias, ricas en sustancias volátiles distintas del agua.
- Luego del proceso de deshidratación, varios productos son bastante higroscópicos; por lo cual es importante colocar la tapa de la cápsula que contiene la muestra inmediatamente después de abrir la estufa e introducirla en un desecador. Además es imperioso pesar tan pronto como la muestra alcance la temperatura ambiente.



1.9.2 Cenizas

El término ceniza se refiere al residuo inorgánico que permanece luego de incinerar la materia orgánica en una muestra de un alimento. Normalmente, en las cenizas no están presentes las mismas sustancias inorgánicas del alimento original debido a las pérdidas por volatilización como sulfuros y haluros o a las interacciones químicas entre los constituyentes (Universidad Nacional Autónoma de México, 2011). Los minerales existentes en alimento cambian a sus formas de carbonato u óxido; o en algunos casos a las formas de fosfato, cloruro o sulfato, dependiendo de la composición y condiciones de ignición (Sathe, 1999).

Al realizar el análisis para cenizas se debe considerar que la determinación es de naturaleza empírica. Por lo tanto, condiciones como temperatura, tiempo de calentamiento, etc. deben ser mencionados y seguidos estrictamente. Tener presente que si la muestra se encontrase contaminada con tierra, la presencia de la misma incrementa el valor de las cenizas. La ceniza obtenida es ligera y por ende puede fácilmente ser levantada por brisas de aire, por lo que se debe tomar precauciones durante el traslado. Cuando la ceniza contiene carbonato de potasio como en la ceniza de frutas, se requiere de un pesaje rápido ya que es de naturaleza higroscópica (Sathe, 1999).

1.9.3 Carbohidratos Totales

El contenido de carbohidratos representa más o menos los azúcares disponibles y almidones presentes en el alimento. Se determina por diferencia sin la realización de ningún análisis propiamente dicho, sino por diferencia estimando del peso total del alimento al sustraer los pesos de proteínas, grasa, cenizas y humedad. No obstante, existen ciertos problemas con este método



para el análisis de carbohidratos totales ya que el cálculo por diferencia engloba componentes distintos de los carbohidratos, como son; lignina, ácidos orgánicos, taninos y ceras sin identificar la gran variedad de carbohidratos. Además, combina todos los errores analíticos de los otros análisis (OMS/FAO, 1999).

1.9.4. Grasa total

El contenido de grasa (algunas veces llamado extracto etéreo o grasa cruda) se puede considerar como un conjunto de lípidos “libres”, es decir aquellos que pueden ser extraídos por disolventes orgánicos (éter etílico, éter de petróleo) (Colegio de bachilleres del estado de Sonora, 2007).

La fracción grasa se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos (ej. Soxhlet); sin embargo, también puede cuantificarse por métodos de extracción que no incluyen disolventes (ej. Gerber) y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos (ej. infrarrojo, densidad) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2011).

En cuanto al contenido graso obtenido mediante el método Soxhlet, se debe resaltar que muchas personas se refieren a esta fracción como el contenido de grasa de la muestra, lo que tiende a ser una sobrestimación ya que el extracto también contiene ácidos orgánicos, aceites, pigmentos, alcoholes, y vitaminas liposolubles. Además se debe considerar el hecho que muchos de los lípidos complejos, tales como fosfolípidos, no son completamente extraídos por este procedimiento (Ensminger, Konlande, & Robson, 1993).



1.9.5 Proteína bruta total

El contenido proteínico de los alimentos sólidos puede determinarse por medio de diversos métodos. La forma más habitual es su cuantificación de forma indirecta y aproximada, bien a partir del contenido en nitrógeno de la muestra, o bien deduciendo su cantidad a partir del contenido de uno de sus aminoácidos particulares que conforma la proteína (García & Fernández , 2013).

El contenido de proteínas es mayoritariamente analizado por el método Kjeldahl el cual mide la cantidad de nitrógeno en el alimento. Se debe tener presente que la cantidad de proteína cruda derivada del análisis representa solo una aproximación del contenido de proteína. Este procedimiento involucra a los dos siguientes supuestos básicos aplicables a los alimentos (Ensminger, Konlande, & Robson, 1993) :

- a) **Las proteínas contienen aproximadamente 16% de nitrógeno.** En realidad, esto apenas representa un promedio. Algunos alimentos contienen proteínas que promedian más del 16% de nitrógeno, mientras otros contienen proteínas con menos cantidad de nitrógeno (Jones, 1941).

- b) **Todo el nitrógeno está en forma de proteínas.** Para algunos alimentos, esto puede ser cierto. En otros alimentos existen un diferente número de compuestos que contienen nitrógeno; por ejemplo, las levaduras contienen grandes cantidades de nitrógeno en forma de ácidos nucleicos.



1.10 Contenido de sal

A pesar de no estar englobado dentro del análisis proximal, por su importancia se incluye la determinación del contenido de sal (cloruro de sodio) en el presente trabajo ya que constituye un parámetro determinado de manera habitual en los alimentos procesados o sin procesar. La importancia deriva de las múltiples funciones que desempeña en los alimentos, el cual es uno de los aditivos alimentarios de mayor empleo en la industria de los alimentos, además de su relevancia en la salud.

La determinación de cloruros en alimentos se realiza siguiendo los principios de volumetría por argentometría que involucra el uso de una solución de nitrato de plata de concentración exactamente conocida como valorante. A partir de la determinación de los cloruros se puede calcular la cantidad de sal (cloruro de sodio) presente en el alimento (Santa Cruz Vera, 2011). Las técnicas más utilizadas para la determinación de este analito en matrices alimentarias son el método de Mohr (valoración directa) y el método de Volhard (valoración indirecta). Estas titulaciones son adecuadas especialmente para alimentos ricos en cloruros debido a la adición de sal durante su proceso de manufactura. Estos métodos han sido muy comunes en la industria alimentaria, pero gradualmente están siendo reemplazados por el uso de electrodos selectivos para cloruros. Los métodos argentométricos (Mohr) presentan algunas consideraciones, tales como (Nollet, 2004):

- a) **La cantidad de indicador debe ser constante.** Si se añade muy poco indicador la concentración de plata debe ser superior después del punto de equivalencia antes de que cualquier precipitación ocurra (cromato de



plata) y por otro lado, si se añade demasiado indicador el cambio de color será difícil de apreciar debido a la intensidad del color amarillo.

b) El método de Mohr trabaja solamente entre un rango de pH de 6-9.

Si se está por encima de este rango de pH, la plata formará un precipitado con el hidróxido y por el contrario si la solución está por debajo de este rango de pH, el cromato se convierte en dicromato de color naranja brillante por lo que obscurece el punto final de la titulación. Para evitar esta dificultad, se suele añadir carbonato de calcio para reducir la acidez de la solución.



2. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de estudio

Estudio cuantitativo analítico no experimental de corte transversal.

2.2 Descripción de la muestra

Con el fin de utilizar harina de centeno como estándar secundario de análisis proximal, se tomó un solo lote de esta harina (25 libras) procedente del norte del país, de origen ambateño. El lote en mención fue compuesto de harina recién molida y fresca, la cual fue conservada en las más óptimas condiciones, fuera del alcance de la luz y en un lugar fresco y cerrado para evitar la humedad.

2.3 Procedimientos analíticos

El análisis de cada macronutriente se realizó en 15 replicados, trabajando 3 replicados por 5 días consecutivos, en cada uno de los laboratorios: Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias y Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Los análisis inter-laboratorio se llevaron a cabo durante el período de 19 de octubre al 20 de noviembre de 2015 (5 semanas) y este trabajo fue organizado como se indica en la Tabla 2.



Análisis de macronutrientes	Semana de Trabajo				
	1	2	3	4	5
Cenizas	L1				L2
Grasa total		L1			L2
Humedad y Materia seca		L1			L2
Proteína bruta total			L2	L1	
Sal (cloruros)			L2		

L1: Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca

L2: Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias

Tabla 2 Cronograma del trabajo de análisis inter-laboratorio

Cabe indicar que el procedimiento para la determinación de un macronutriente específico fue ejecutado por un solo analista y en ambos laboratorios.

2.3.1 Fundamentos de los parámetros analizados

2.3.1.1 Humedad y contenido de materia seca

La humedad y el contenido de materia seca se determinan mediante la medición de la pérdida de peso de la muestra después del tratamiento térmico a 70-130°C. Se puede hacer por calentamiento en una plancha caliente, horno de aire caliente o un horno de vacío. Las interacciones entre las diferentes sustancias y la evaporación de otras sustancias diferentes al agua pueden



ocurrir, y esto puede ser frenado por adsorción sobre arena de mar tratada (Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca, 2010).

2.3.1.1.1 Cálculos de humedad y contenido de materia seca

$$P_2 = (P_c + M)_{final} - \text{peso de cápsula}$$

$$\% \text{ *Materia seca* } = \frac{P_2 \times 100}{P_1}$$

$$\% \text{ *Humedad* } = 100\% - \% \text{ *Materia seca* }$$

P_1 (Peso 1): Peso de la muestra

P_2 (Peso 2): Peso de la muestra desecada

$(P_c + M)$ final: Pesaje final de la cápsula más la muestra

2.3.1.2 Contenido de cenizas

El contenido de cenizas de productos alimenticios se considera como el material inorgánico presente en el alimento y se determina como el residuo que queda después de calcinar la muestra. La muestra se incinera a temperaturas elevadas, entre 550-600 °C, para eliminar todo el material orgánico. Debido a la volatilización de algunos compuestos, una subestimación del contenido de cenizas puede ocurrir (Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca, 2010).

2.3.1.2.1 Cálculo de contenido de cenizas

$$PC = (P_{cris} + C) - P_{cris}$$

$$\% \text{ *Ceniza* } = \frac{P_C \times 100}{P_m}$$



P_{cris} : Peso del crisol vacío
 $P_{\text{cris}} + C$: Peso del crisol más la ceniza
 PC : Peso de ceniza
 P_m : Peso de la muestra

2.3.1.3 Contenido de grasa total por el método de Weibull-Soxhlet

El método universal para determinar el contenido de grasa en los alimentos es el método de Weibull-Soxhlet. En este método la muestra pesada se calienta en un baño de vapor con ácido clorhídrico diluido y luego se hierve. La solución con la muestra se filtra a través de un filtro humedecido y se lava con agua caliente. El papel filtro se seca en una estufa y se coloca directamente en un aparato de Soxhlet para una extracción con éter de petróleo. Después de esta extracción fría discontinua, el solvente se evapora, el residuo de grasa se seca y finalmente se pesa (Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca, 2010).

2.3.1.3.1 Cálculo de contenido de grasa total

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_1 - P_0}{P_m}$$

P_1 = Peso del balón después de la extracción de grasa y secado
 P_0 = Peso del balón
 P_m = Peso de la muestra

2.3.1.4 Contenido de proteína bruta total por el método de Kjeldahl

El método de Kjeldahl se basa en la combustión húmeda de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de metales y otros catalizadores para efectuar la reducción de nitrógeno orgánico en la muestra a amoníaco, que se mantiene en solución en forma de sulfato de amonio.



La digestión, debiendo ser hecha en medio alcalino, se destila a vapor para liberar el amoníaco que es atrapado y valorado. De todos los catalizadores empleados, el mercurio como óxido de mercurio es generalmente aceptado ser más eficaz.

Tradicionalmente, el amoníaco liberado de la digestión en medio alcalino, se destila en una cantidad estándar de ácido diluido que finalmente se valora con álcali estándar para dar el contenido de nitrógeno orgánico de la muestra. En la actualidad, se suele destilar sobre una solución de ácido bórico 2% y se valora el amoníaco directamente con ácido clorhídrico (Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca, 2010).

El nitrógeno orgánico total permite establecer el contenido de nitrógeno proteico. Para calcular el contenido de proteína cruda en función al contenido de nitrógeno total, se recurre al factor de conversión, definido en función del tipo de alimento, el factor estándar es de 6.25 (Shapiro, 1995).

2.3.1.4.1 Cálculo de contenido de proteínas

Aunque para la determinación de proteínas en ambos laboratorios se basa el método de Kjeldahl, los procedimientos tenían alguna diferencias referentes al equipo utilizado, reactivos, tiempos, entre otras. Por lo tanto, en cada laboratorio se siguió una manera diferente en cuanto al cálculo de resultados.

Cálculo de contenido de proteínas en Laboratorio 1

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{(V_H \times N_H \times K_H - V_{OH} \times N_{OH} \times K_{OH}) \times 0.014 \times 100 \times F \times D_i}{P_m}$$

V_H : Volumen de ácido sulfúrico

V_{OH} : Volumen de hidróxido de sodio

N_H : Normalidad de ácido sulfúrico

N_{OH} : Normalidad de hidróxido de sodio

K_H : Constante de ácido sulfúrico

K_{OH} : Constante de hidróxido de sodio

F: Factor de conversión de nitrógeno total a proteína bruta



D_i : Factor de dilución

P_m : Peso de la muestra

Cálculo de contenido de proteínas en Laboratorio 2

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{V_{HCl} \times N_{HCl} \times 14 \times F \times 100 \times 5}{1000 \times P_m}$$

V_{HCl} : Volumen de ácido clorhídrico

N_{HCl} : Normalidad de ácido clorhídrico

F: Factor de conversión de nitrógeno total a proteína bruta

P_m : Peso de la muestra

2.3.1.5 Contenido de sal por el método de Mohr

El método se basa en la determinación volumétrica de iones cloruro utilizando nitrato de plata (argentometría). La sal se extrae de la matriz con agua caliente. La solubilidad del NaCl varía de 35.7 g/100 ml a 0°C a 39.1 g/100 ml a 100 ° C. Luego de que la plata del nitrato ha formado un complejo con todo el cloruro disponible de la muestra, la plata reacciona con el cromato que ha sido adicionado a la muestra para formar una solución de color naranja (cromato de plata). El volumen de nitrato de plata utilizado para reaccionar con los cloruros es utilizado para calcular el contenido de cloruro de sodio en la muestra (Nielsen, 2010).

2.3.1.5.1 Cálculo de contenido de sal

$$\% \text{ Sal} = \frac{(V - V_B) \times 0.5845}{P_m}$$

$$\text{mmol Cl}^- = M_{AgNO_3} \times V_{AgNO_3}$$

$$\text{Masa Cl}^- = \text{mmol Cl}^- \times 35.45_{\text{mg/mmol}}$$



$$\% \text{ Cloruros} = \frac{100 \times \text{Masa } Cl^{-}}{P_m (mg)}$$

V: Volumen de titulación	M_{AgNO_3} : Concentración del nitrato de plata
V_B : Volumen de blanco	V_{AgNO_3} : Volumen del nitrato de plata
P_m : Peso de la muestra	

2.3.2 Procedimientos analíticos

En el presente trabajo de aquí en adelante, por razones de abreviación, se referirá a los laboratorios de análisis de la siguiente manera:

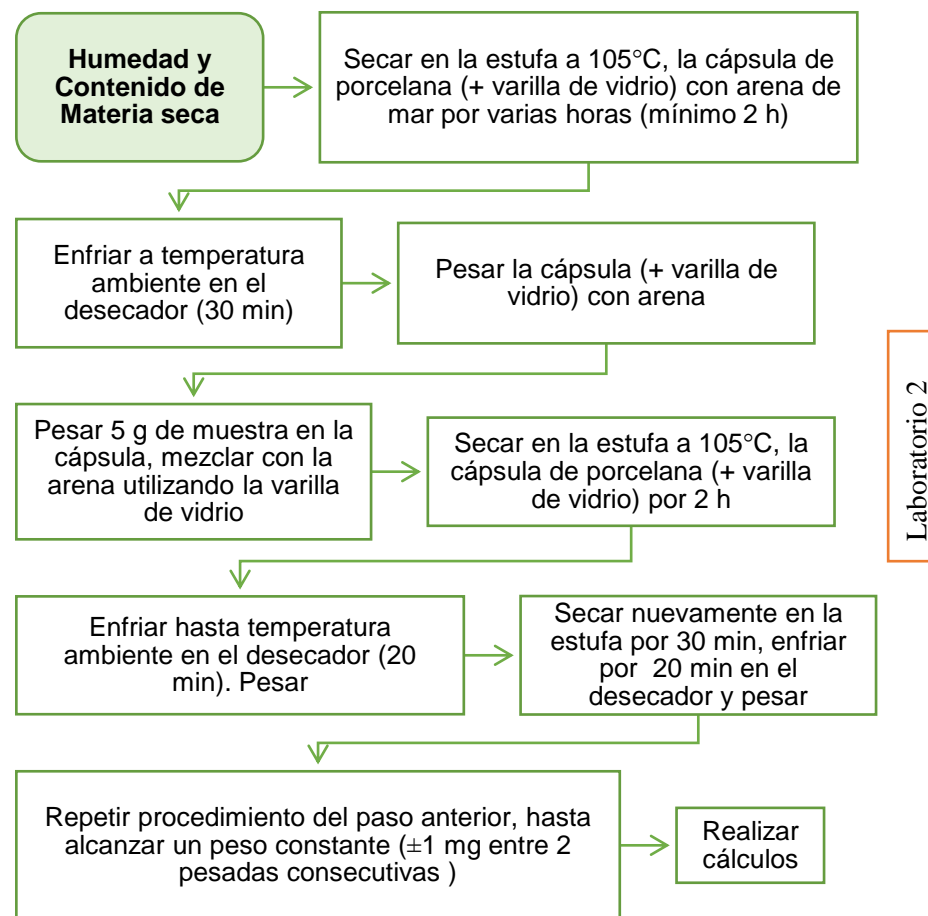
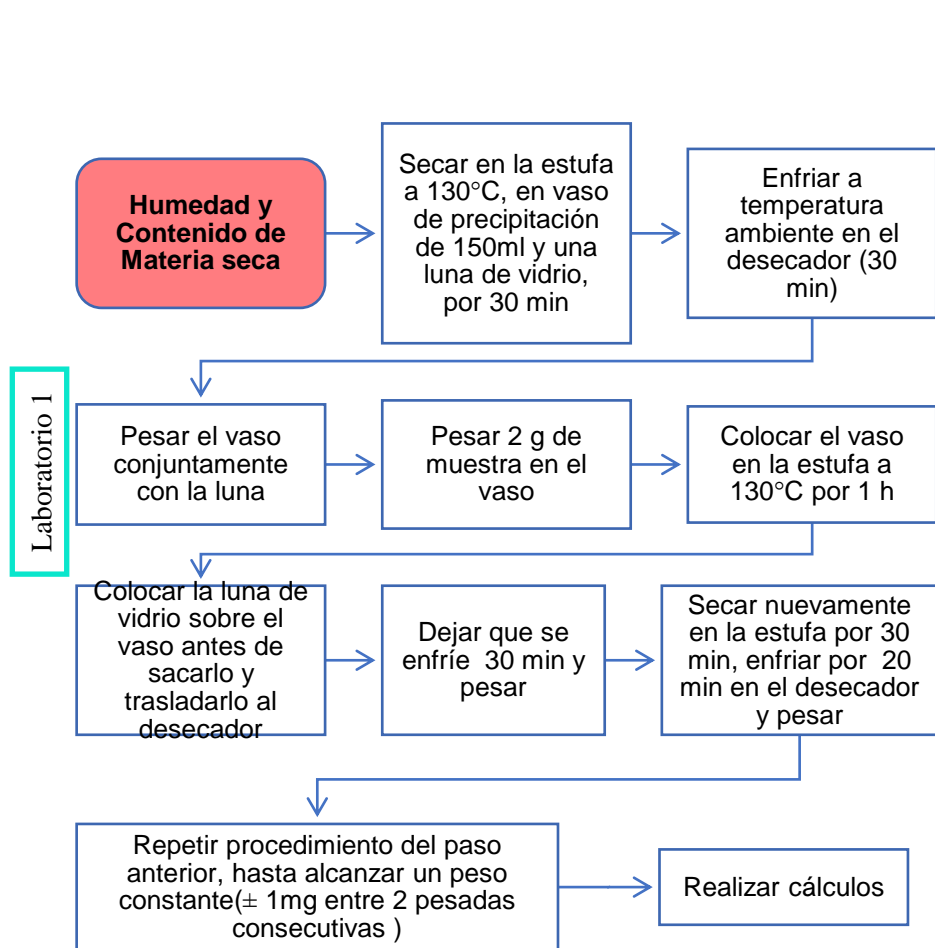
Laboratorio de Análisis	Denominación
Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca	Laboratorio 1
Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias	Laboratorio 2

Tabla 3 Descripción de los laboratorios de análisis

A continuación se describen a manera de flujogramas de los procedimientos analíticos de análisis proximal en cada uno de los laboratorios.



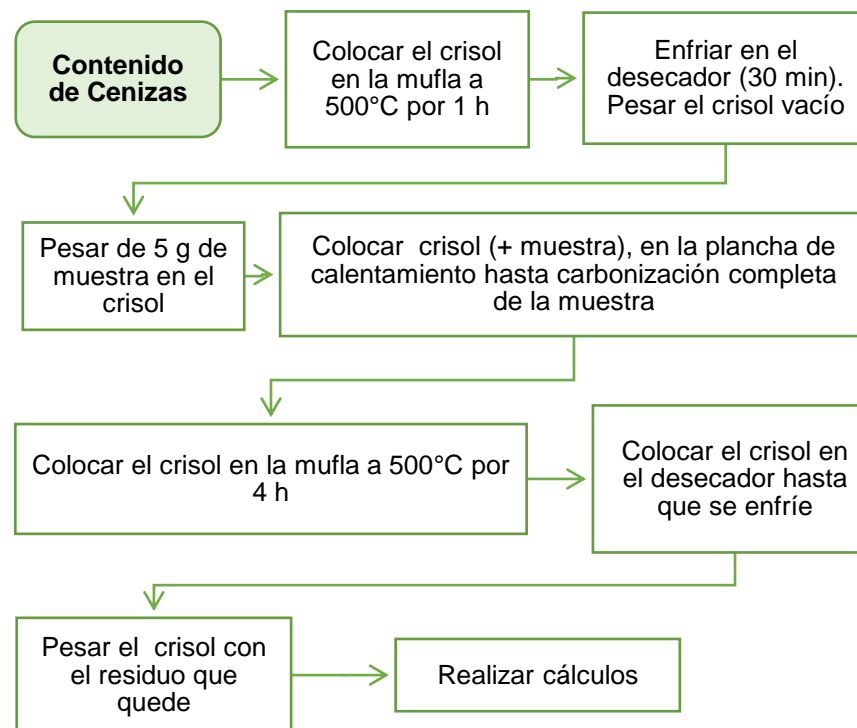
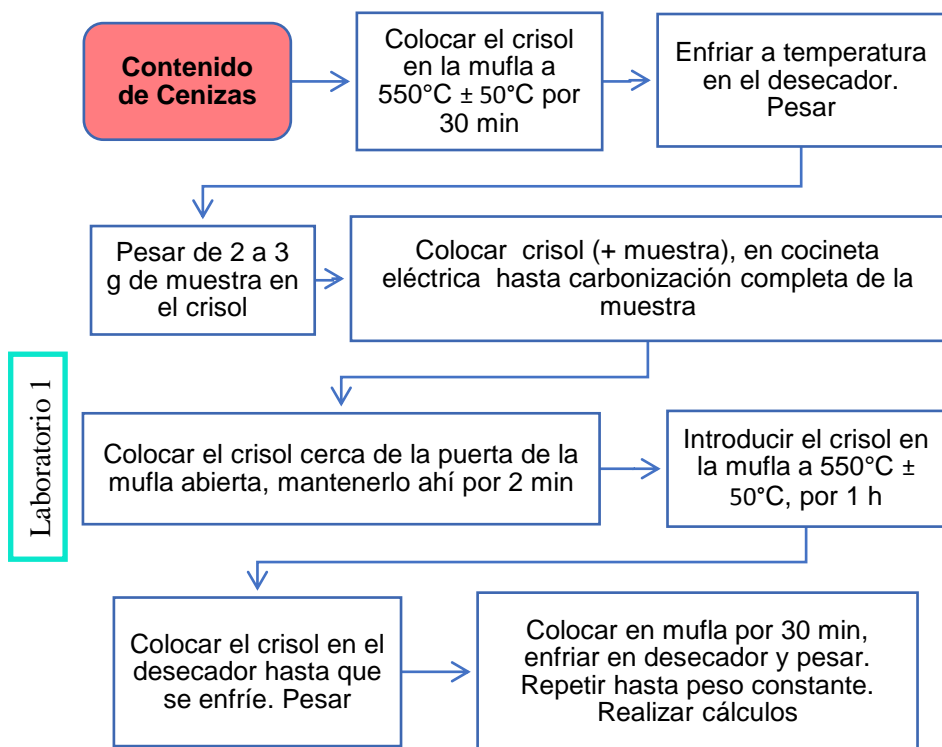
Determinación de Humedad y Materia





Determinación de Cenizas

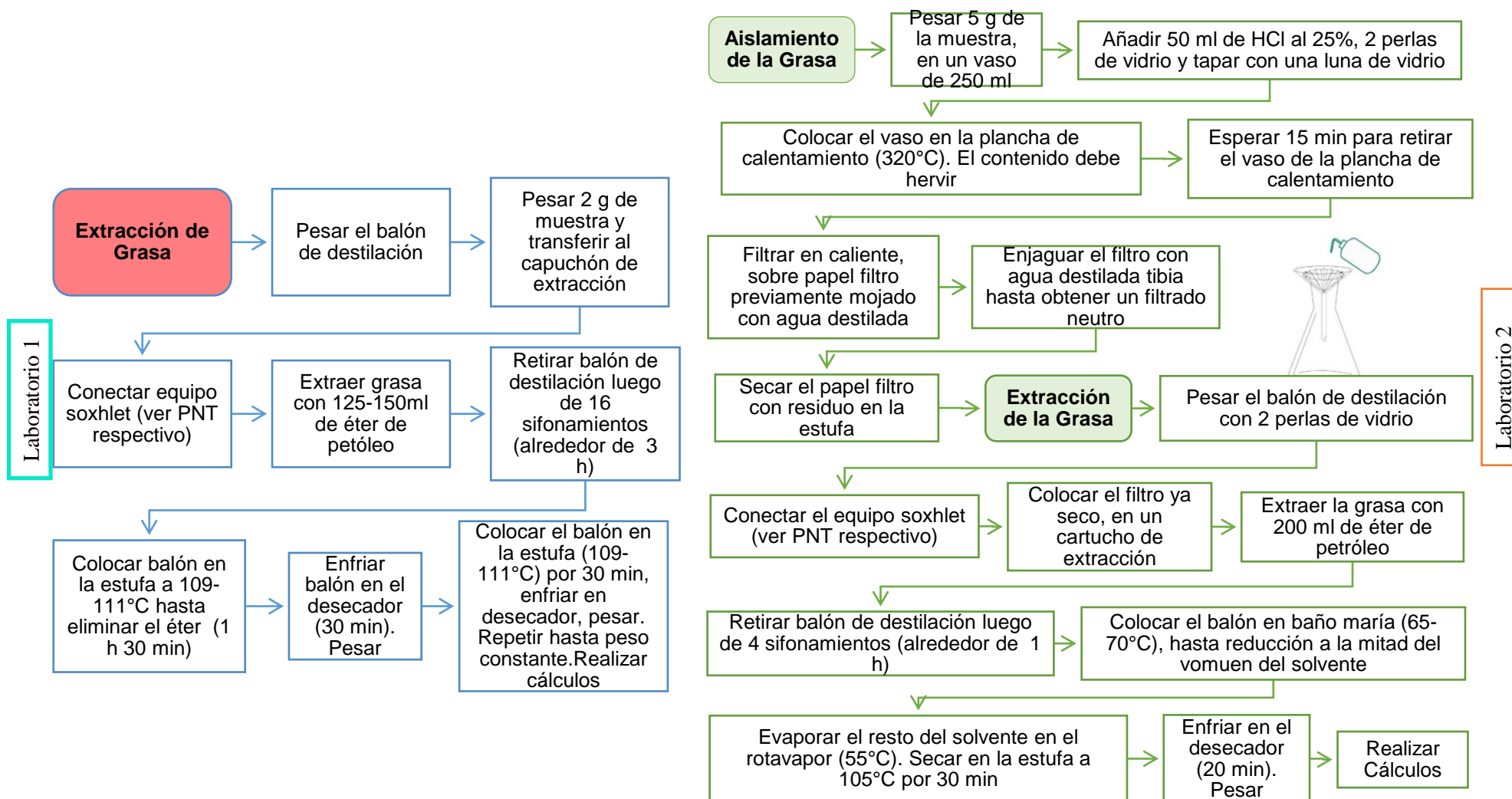
Universidad de Cuenca





Determinación de Grasa total

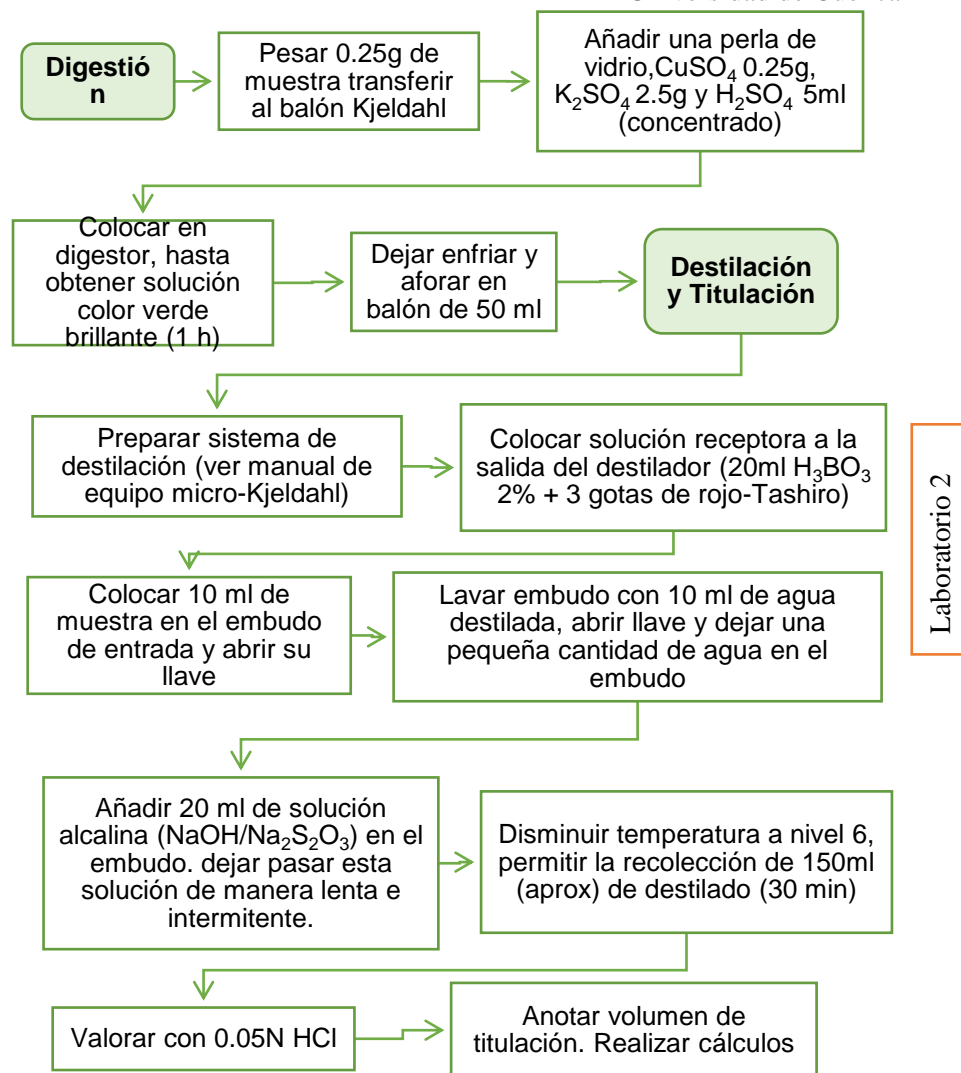
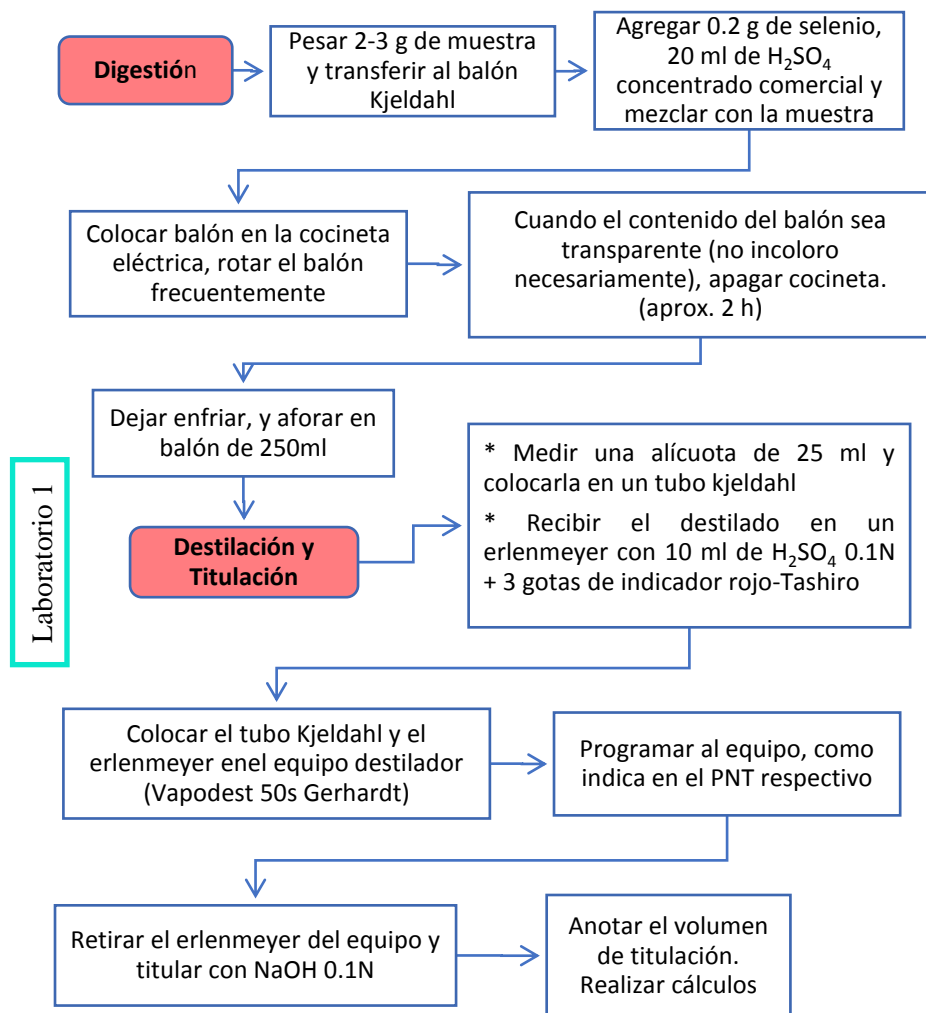
Universidad de Cuenca





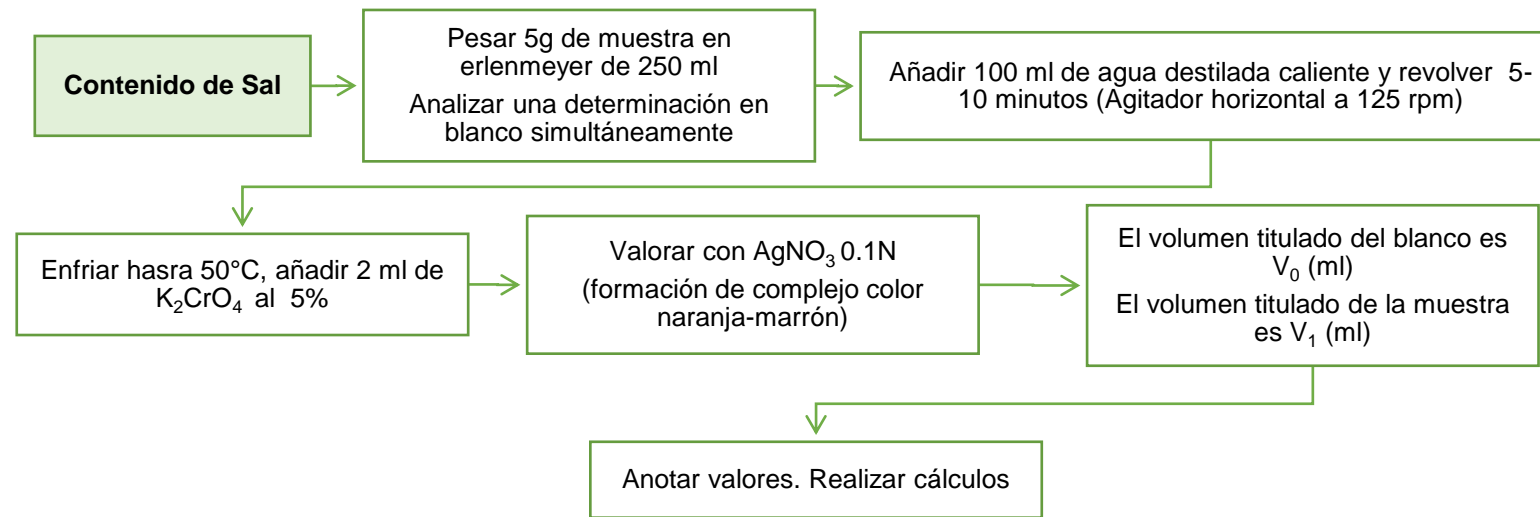
Determinación de Proteína bruta total

Universidad de Cuenca





Determinación de Sal



Laboratorio 2

Este proceso analítico se realizó únicamente en el “Laboratorio 2” debido a que en el Laboratorio 1” no se lleva a cabo esta determinación.



2.3.3 Diferencias de los procedimientos analíticos entre laboratorios

Los procedimientos analíticos seguidos en los dos laboratorios de este estudio presentaban algunas diferencias que se exponen a continuación (Tabla 4):

Análisis de macronutrientes	Laboratorio 1	Laboratorio 2
Humedad y Materia Seca	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 2-3 g• Desección en vasos de precipitación sin arena de mar• El desecador contiene cloruro de calcio• Temperatura de desecación: 130°C	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 5 g• Desección en cápsulas de porcelana con arena de mar lavada, brillante• El desecador contiene partículas de silica gel• Temperatura de desecación: 105°C
Cenizas	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 2-3 g• Temperatura de calcinación: 550°C ±50°C• Tiempo de calcinación: 1 hora	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 5 g• Temperatura de calcinación: 500°C• Tiempo de calcinación: 4 horas
Grasa total	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 2-3 g• Muestra previamente desecada• Muestra no se somete a un proceso de hidrólisis para el aislamiento de grasa• Evaporación de solvente (éter de petróleo) en estufa	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 5 g• Muestra sin desecar.• Muestra se somete a un proceso de aislamiento de grasa (por hidrólisis ácida)• Evaporación de solvente, éter de petróleo en baño María y rotavapor.
Proteína bruta total	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 2-3 g• Equipo de destilación: macro-Kjeldahl semiautomático• Digestión: en cocineta eléctrica.• Ácido utilizado en la digestión: H₂SO₄ concentrado comercial• Catalizador en la digestión: selenio metálico en polvo• Solución receptora de la	<ul style="list-style-type: none">• Muestra: 0.25 g• Equipo de destilación: micro-Kjeldahl, no automático.• Digestión: en plancha de calentamiento del propio equipo.• Ácido utilizado en la digestión: H₂SO₄ concentrado calidad analítica• Catalizadores en la digestión : CuSO₄ y K₂SO₄• Solución receptora de la



	<p>destilación: H_2SO_4 0.1N + indicador rojo de Tashiro</p> <ul style="list-style-type: none">• La solución alcalina: NaOH al 45%• Solución titulante: NaOH 0.1N	<p>destilación: H_3BO_3 al 2% + indicador rojo de Tashiro</p> <ul style="list-style-type: none">• La solución alcalina: NaOH (50%) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (8%)• Solución titulante: HCl 0.05N
--	---	---

Tabla 4 Diferencias en las metodologías de trabajo entre laboratorios.

2.4 Análisis estadístico

En el presente trabajo se planteó realizar un estudio inter-laboratorio entre el Laboratorio 1 y 2, para lo que se compararon los valores medios de análisis mediante pruebas T de Student de una cola. La evaluación de la influencia de la temperatura en los análisis se evaluó mediante regresiones lineales simples. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un nivel de significancia del 5%.

Para determinar la repetibilidad de los análisis se calculó la precisión intra e inter-día siguiendo el método análisis de varianzas (ANOVA) y se expresó como porcentaje de coeficiente de variación (% CV).

Todos análisis fueron desarrollados utilizaron los programas Microsoft Excel 2013 y STATA 10.0.

Además, se construyeron las gráficas de control de Levey-Jennings de cada parámetro para cada laboratorio (15 replicados) en el programa Excel 2013.



3. RESULTADOS

3.1 Resultados generales del análisis proximal

Los análisis inter-laboratorio se llevó a cabo en dos laboratorios de la Universidad de Cuenca: Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca (**Laboratorio 1: L1**) y el Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias (**Laboratorio 2: L2**). En total se realizaron 30 réplicas de análisis (15 en cada laboratorio) de cada uno de los siguientes parámetros del análisis proximal del estándar secundario (centeno): humedad, materia seca, cenizas, proteína bruta total, grasa total y carbohidratos totales. La determinación del contenido de sal (cloruros) se suele llevar a cabo solo en uno de los laboratorios por lo que se realizaron solo 15 réplicas de análisis (Anexo 1, Anexo 2). Con el fin de determinar la precisión inter e intra-día, en cada laboratorio las 15 réplicas de análisis fueron distribuidas en 5 días consecutivos (3 réplicas por día), en cada uno de los laboratorios (Anexo 3).

Los resultados generales de estos análisis se presentan a continuación en la Tabla 5.



	Humedad	Materia seca	Cenizas	Proteína bruta total	Grasa total	Carbohidratos totales	Sal (cloruros)
Laboratorio 1:							
<i>Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca</i>							
$\bar{X} \pm DE$	13.20 ± 0.09	86.80 ± 0.09	1.78 ± 0.03	10.17 ± 0.29	1.74 ± 0.17	73.10 ± 0.27	*
%CV inter-día	0.3	0.1	1.3	1.2	6.5	0.1	*
%CV intra-día	0.7	0.1	1.2	2.7	6.8	0.4	*
Laboratorio 2:							
<i>Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias</i>							
$X \pm DE$	12.09 ± 0.07	87.91 ± 0.07	1.78 ± 0.03	9.63 ± 1.22	1.59 ± 0.15	74.91 ± 1.292	0.26 ± 0.01
%CV inter-día	0.4	0.1	1.3	8.9	6.7	1.2	3.7
%CV intra-día	0.4	0.05	1.3	6.4	6.3	0.8	2.64

Abreviaturas: \bar{X} , media; DE, desviación estándar; CV, coeficiente de variación; *, no se realiza análisis

Tabla 5 Resultados generales del análisis proximal de la harina de centeno (patrón secundario) en ambos laboratorios: de promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE), precisión intra- e inter-día (%CV)



3.2 Comparación inter-laboratorio

El estudio inter-laboratorio se realizó en base a la comparación de los valores medios de análisis de proteína bruta total, grasa total, humedad, materia seca, ceniza carbohidratos totales por diferencia obtenidos en cada laboratorio entre el Laboratorio 1 y 2. La comparación se realizó mediante pruebas T de Student de una cola utilizando un nivel de significancia del 5%.

		Media \pm DE	Intervalo de confianza al 95%	Valor de P
Proteína bruta total	L1	10.17 \pm 0.29	10.02 - 10.33	0.1047
	L2	9.63 \pm 1.22	8.95 - 10.31	
Grasa total	L1	1.74 \pm 0.17	1.65 - 1.86	0.016*
	L2	1.59 \pm 0.15	1.51 - 1.68	
Humedad	L1	13.20 \pm 0.09	1.65 - 1.84	<0.001*
	L2	12.09 \pm 0.07	1.51 - 1.68	
Materia seca	L1	86.80 \pm 0.09	86.75 - 86.85	<0.001*
	L2	87.91 \pm 0.07	87.86 - 87.95	
Ceniza	L1	1.78 \pm 0.03	1.76 - 1.80	0.6296
	L2	1.78 \pm 0.03	1.76 - 1.80	
Carbohidratos totales	L1	73.10 \pm 0.27	72.95 - 73.25	<0.001*
	L2	74.91 \pm 1.29	74.19 - 75.62	

L1: Laboratorio de Análisis Bromatológico para atención al público de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca

L2: Laboratorio de Alimentos y Nutrición (VLIR-IUC) del Departamento de Biociencias

* Diferencia estadísticamente significativa

Tabla 6 Comparación inter-laboratorio en base a la Prueba T de Student

En general, los valores medios de análisis fueron mayores en el laboratorio 1. Según las pruebas T de Student, se observaron diferencias estadísticamente significativas para grasas ($P=0.016$), humedad y materia seca ($P<0.001$) y para carbohidratos ($P<0.001$). Además, los valores medios de los resultados

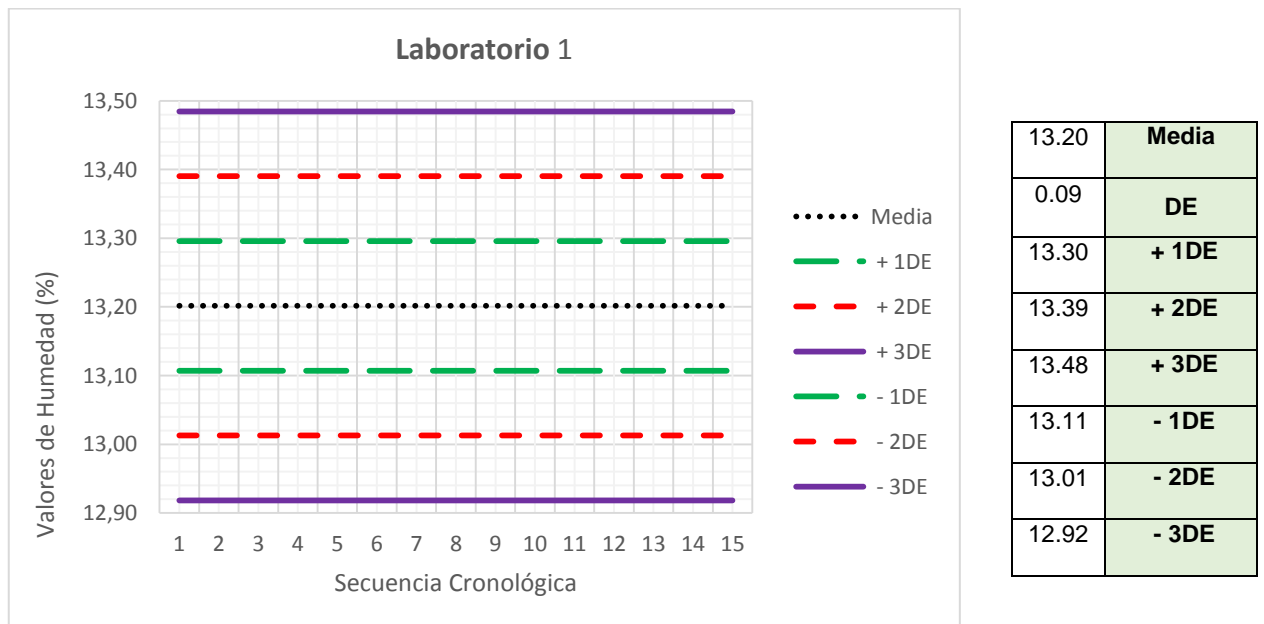


obtenidos en ambos laboratorios no difirieron en más de un 15 %, oscilando entre 0.33% (cenizas) al 9% (proteína).

3.3 Gráficas control de Levey-Jennings

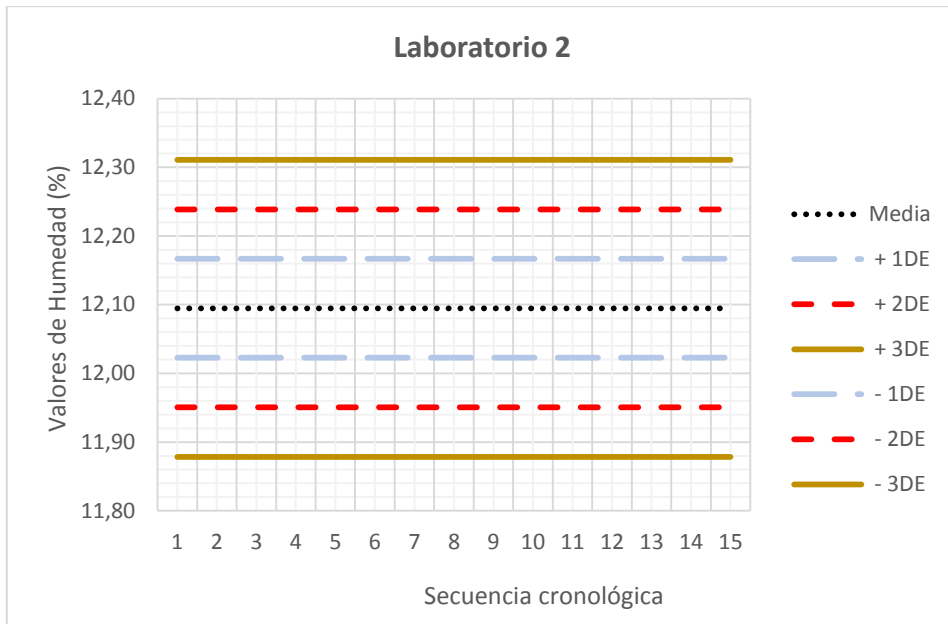
Con los resultados obtenidos en cada laboratorio se realizaron las gráficas Levey-Jennings respectivas para cada determinación del análisis proximal. Se incluyó además la gráfica del contenido de sal realizado en el laboratorio 2 (Figura 5).

Figura 5. Gráficas control Levey-Jennings: **5.a.** Humedad Laboratorio 1, **5.b.** Humedad del Laboratorio 2, **5.c.** Materia seca, **5.d.** Materia seca del laboratorio 2, **5.e.** Ceniza del laboratorio 1, **5.f.** Ceniza del laboratorio 2, **5.g.** Grasa total del laboratorio 1, **5.h.** Grasa total del laboratorio 2, **5.i.** Proteína bruta total del laboratorio 1, **5.j.** Proteína bruta total del laboratorio 2, **5.k.** Contenido de sal del laboratorio 2.



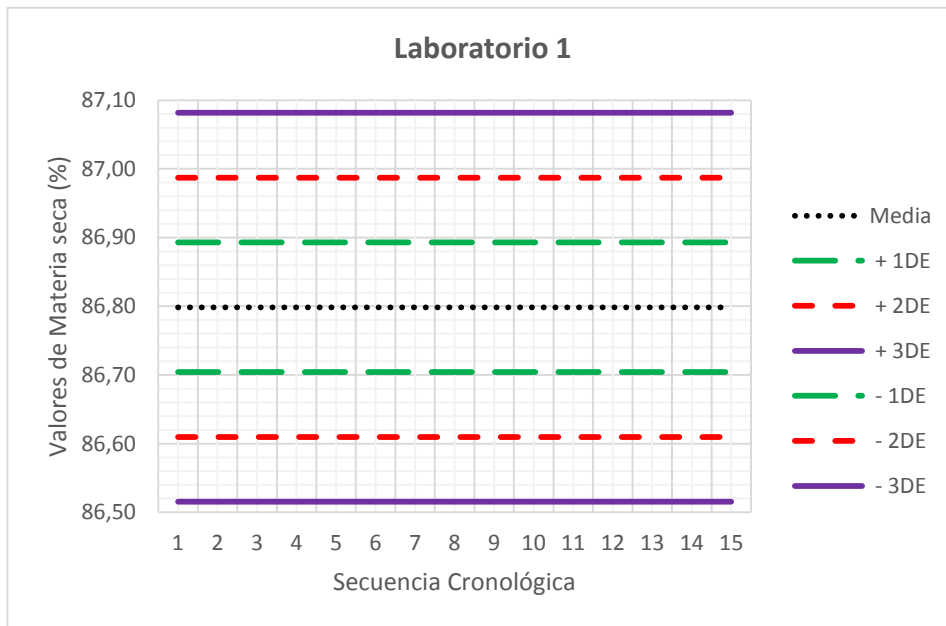
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 a Gráfica control de humedad del laboratorio 1



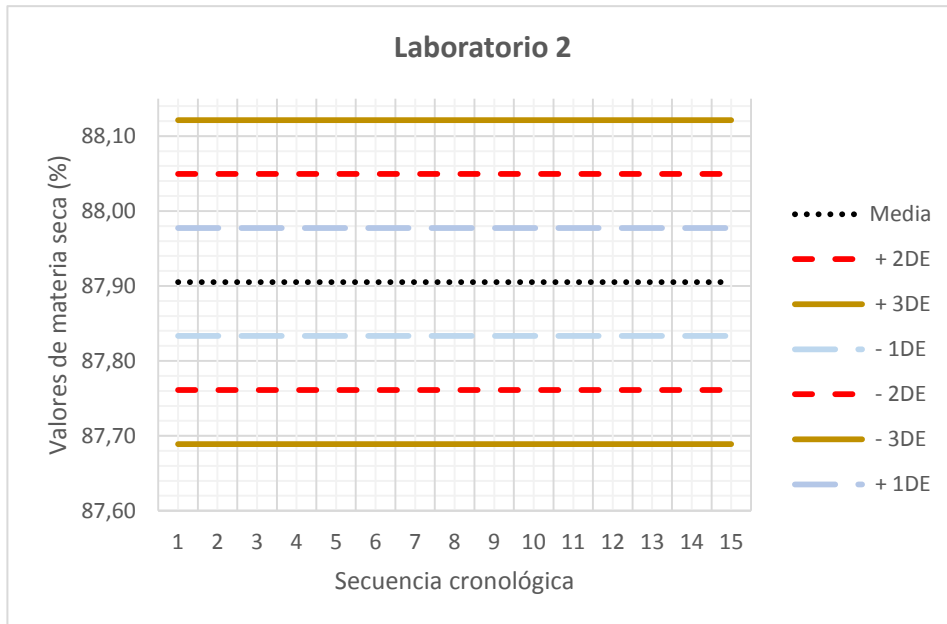
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 b Gráfica control de humedad del laboratorio 2



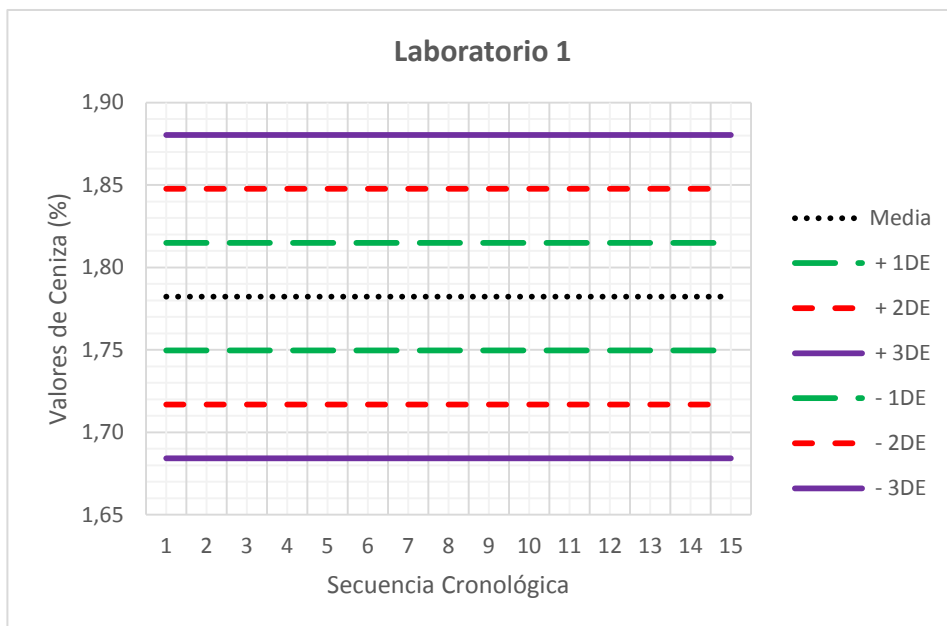
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 c Gráfica control de materia seca del laboratorio 1



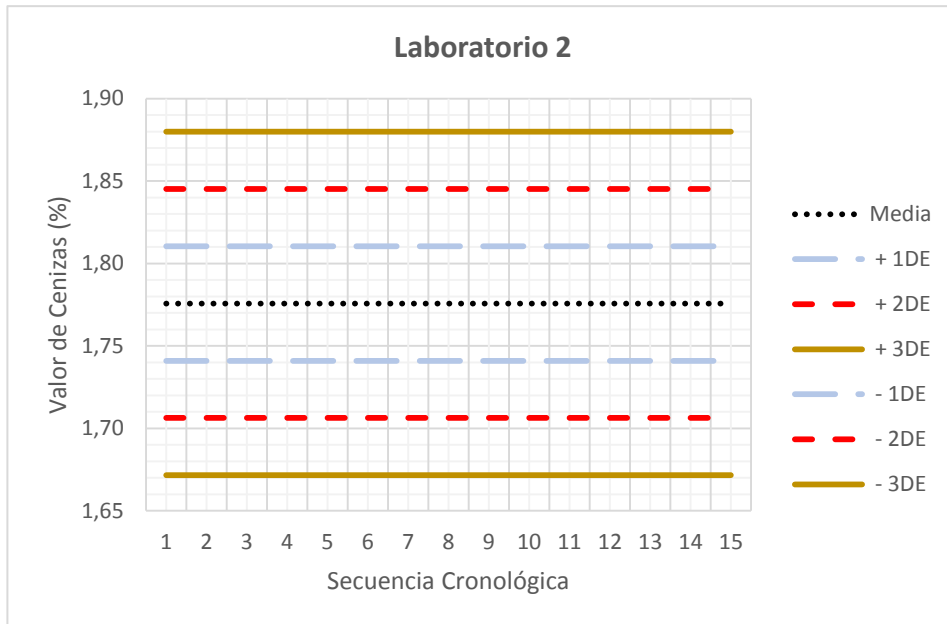
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 d Gráfica control de materia seca del laboratorio 2



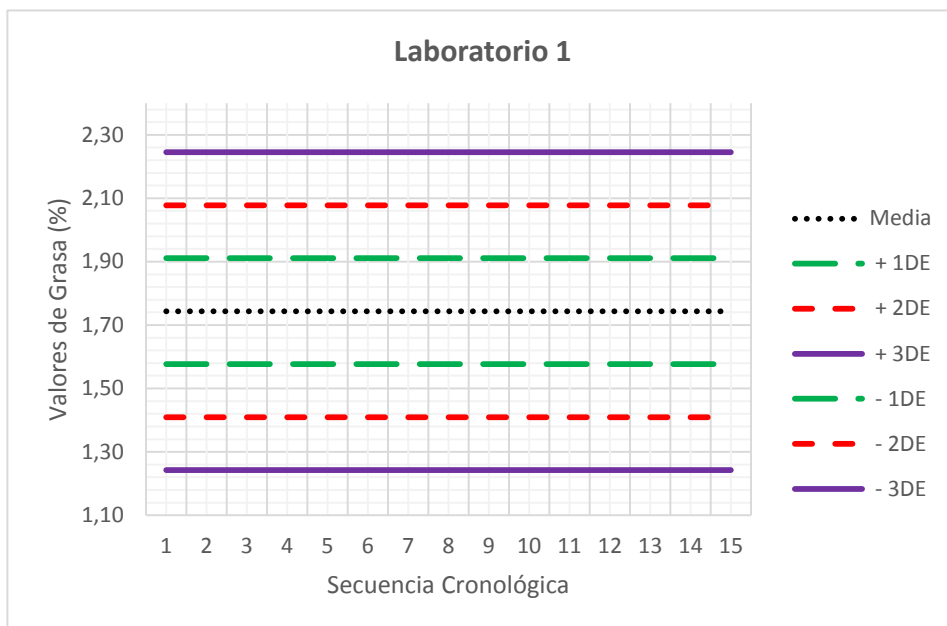
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 e Gráfica control de ceniza del laboratorio 1



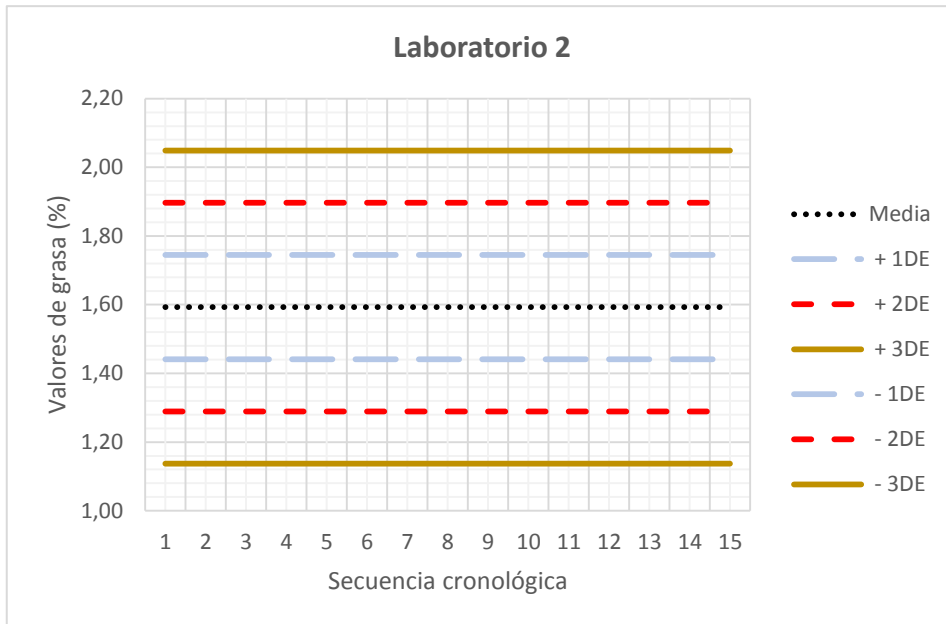
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 f Gráfica control de ceniza del laboratorio 2



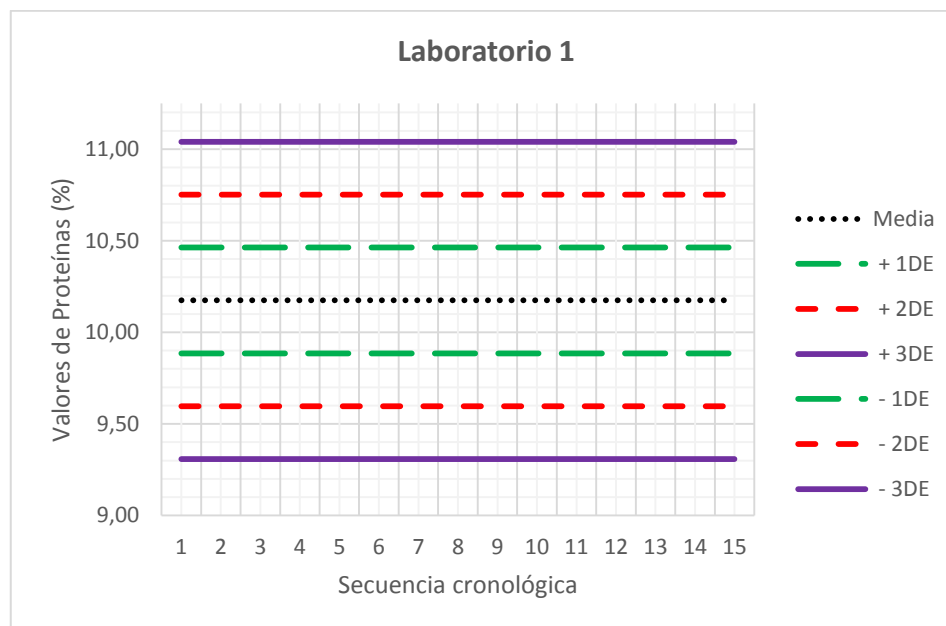
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 g Gráfica control de grasa total del laboratorio 1



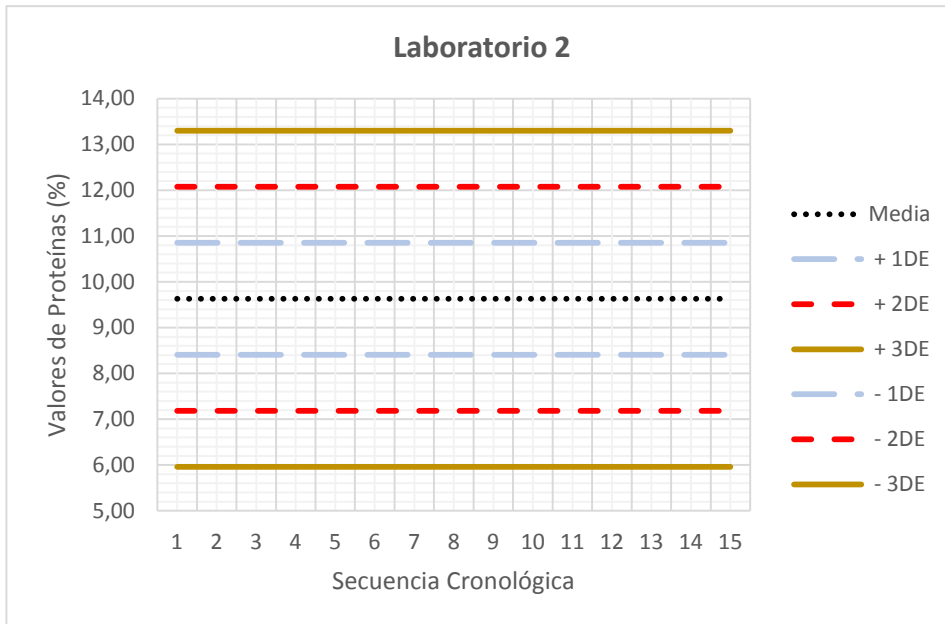
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 h Gráfica control de grasa total del laboratorio 2



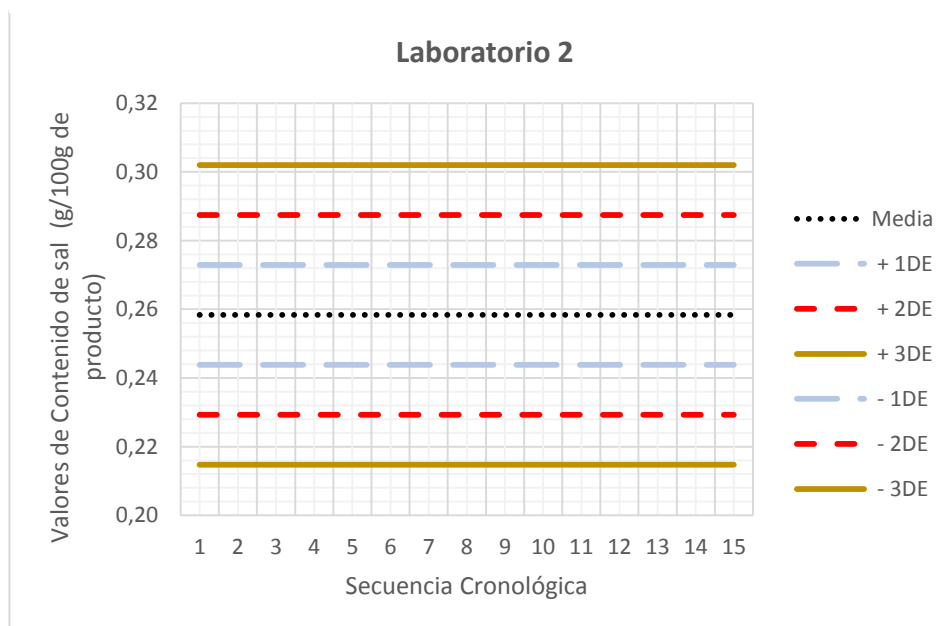
Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 i Gráfica control de proteína bruta total del laboratorio 1



Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 j Gráfica control de proteína bruta total del laboratorio 2

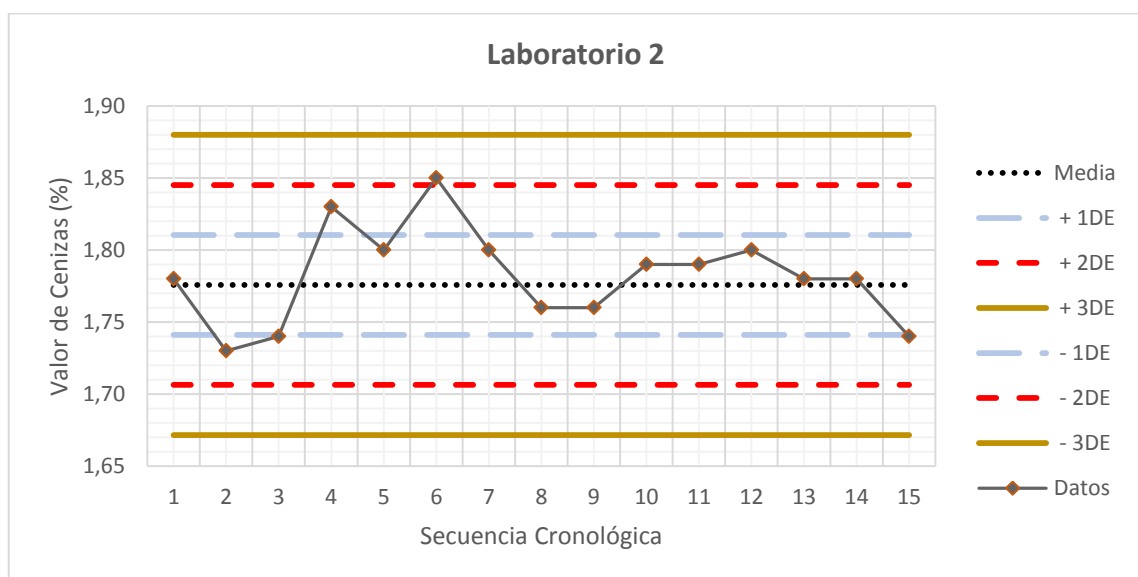


Abreviatura: DE, desviación estándar

Figura 5 k Gráfica control de contenido de sal del laboratorio 2

3.3.1 Ejemplo de aplicación de gráfica control

A continuación se ejemplifica el uso de gráficas de control Levey-Jennings, tomando las determinaciones analíticas de cenizas en harina de centeno obtenidos en el laboratorio 2 para elaborar la gráfica de control con sus respectivos límites ($\pm 1DE$, $\pm 2 DE$, $\pm 3 DE$), y tomando las determinaciones analíticas de ceniza obtenidas en el laboratorio 1 como la serie de datos de análisis (puntos graficados dentro de la gráfica Levey-Jennings) (**Figura 21**).



Datos	1.78	1.73	1.74	1.83	1.80	1.85	1.80	1.76	1.76	1.79	1.79	1.80	1.78	1.78	1.74
-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Figura 6. Ejemplo de aplicación de gráfica control: gráfica de control de ceniza del laboratorio 2 con serie de datos obtenidos en el laboratorio 1.

En este ejemplo, al aplicar las Reglas de Westgard. Se observa que la serie de datos violenta la regla “ 1_{2s} ” que indica un error aleatorio, por lo tanto es aceptable.



3.4 Influencia de la temperatura en los análisis

La evaluación de la temperatura en los análisis se realizó mediante regresiones lineales simples, mediante las cuales se observaron las siguientes asociaciones relevantes en cuanto a la influencia de la temperatura en cada laboratorio:

- Una asociación negativa estadísticamente significativa entre la temperatura y el contenido de humedad en el laboratorio 2 ($P= 0.035$). El contenido de materia seca al ser dependiente del contenido de humedad posee la misma significancia estadística.
- Una asociación estadísticamente significativa entre la temperatura y proteína bruta total en ambos laboratorios, siendo una asociación negativa en el laboratorio 1 ($P = 0.034$) mientras en el laboratorio 2 es una asociación positiva ($P= 0.013$).
- Una asociación positiva estadísticamente significativa entre la temperatura y grasa en el laboratorio 1 ($P < 0.001$).
- Una asociación negativa estadísticamente significativa entre la temperatura y cenizas en el laboratorio 2 ($P= 0.011$).



4. DISCUSIÓN GENERAL

El análisis inter-laboratorio constituye una herramienta externa para asegurar el control de calidad entre laboratorios, permitiendo a los participantes detectar errores insospechados y deficiencias en su metodología (Amaral & Lucas, 2003).

La comparación inter-laboratorio realizada en este trabajo se puede catalogar como un ensayo colaborativo enfocado en la precisión (repetibilidad) de los análisis realizados en cada laboratorio. De manera indirecta, el estudio se enfoca en la exactitud (reproducibilidad) ya que los “valores reales” de la composición química de la harina de centeno corresponden al pool de resultados obtenidos en ambos laboratorios considerados a su vez como los análisis requeridos para establecer al harina de centeno como un patrón secundario para el análisis proximal. Estos datos generados permitieron también la realización de gráficas de control y el posterior control de datos dentro de los dos laboratorios participantes. Por otro lado, se encontraron diferencias entre los laboratorio en cuanto a la ejecución y resultados de los análisis. A continuación, se discuten las posibles causas de estas diferencias.

En ambos laboratorios se observó que el coeficiente de variación inter-día (%CV inter-día) e intra-día (%CV intra-día) no sobrepasó el 15% (Tabla 5). De hecho son valores relativamente bajos por lo que la variabilidad no sería atribuible en su totalidad a la ejecución de los análisis (errores del analista) y podría pensarse en otras posibilidades como las diferencias en las metodologías y equipos de análisis, y en menor grado al azar.



Los coeficientes de variación de los distintos macronutrientes son similares en los laboratorios involucrados en el estudio, a excepción de la proteína bruta total y carbohidratos totales. En el caso de carbohidratos, esta discrepancia es debida al método de cálculo por diferencia, ya que es un método no analítico donde los errores provenientes del análisis del resto de macronutrientes se acumulan y se refleja en el valor de carbohidratos. Para el caso de proteínas, esta discrepancia podría atribuirse a la metodología y equipos empleados, pues es en donde se observó la mayor diferencia en el coeficiente de variación, (*Laboratorio 1; CV inter-día = 1.2% & CV intra-día = 2.7%, laboratorio 2; CV inter-día = 8.9% & CV intra-día = 6.4%*). Si bien ambas metodologías trabajan en base al método de Kjeldahl, en el laboratorio 1 se utiliza un equipo automático que opera con macro-cantidades, mientras en el laboratorio 2 el equipo es semiautomático y opera con micro-cantidades. Esto implica también variaciones en los volúmenes de manejo en la digestión y destilación: en el laboratorio 1 (cantidad macro de muestra) se afora a 250 ml, mientras en el laboratorio 2 (cantidad micro de muestra) se afora a 50 ml para usar 25 ml y 10 ml respectivamente para la destilación. Sin embargo, esto no debería contribuir a las diferencias en los resultados pues al final se utilizan factores de corrección de dilución para los cálculos.

Además existen otras diferencias que fueron remarcadas en la Tabla 4, tales como:

- a) Catalizadores, mientras en el laboratorio 2 se utilizan CuSO_4 (reducción de nitrógeno orgánico a amoníaco) y K_2SO_4 (incrementa temperatura de la reacción), en el laboratorio 1 se utiliza selenio metálico como único catalizador (reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco)



- b) Solución alcalina, en el laboratorio 1 consiste en una solución al 45% de NaOH mientras en el laboratorio 2 está constituida por 50% NaOH y 8% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
- c) Solución receptora de la destilación, en el laboratorio 1 se utiliza H_2SO_4 0.1N mientras en el laboratorio 2 es el H_3BO_3 al 2%.
- d) Solución valorante, en el laboratorio 1 se utiliza NaOH 0.1N y en el laboratorio 2 HCl 0.05N.

Por otro lado, debe considerarse que al realizar la comparación inter-laboratorio mediante la prueba T de Student, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el contenido de proteínas ($P= 0.1047$).

El caso de la grasa total es diferente, los coeficientes de variación no son considerablemente elevados (*Laboratorio 1; CV inter-día = 6.5% & CV intra-día = 6.8%, laboratorio 2; CV inter-día = 6.7% & CV intra-día = 6.3%*), pero si más altos que para los otros parámetros analizados (a excepción de proteína). Por otro lado, aunque los valores de los coeficiente de variación entre ambos laboratorios son muy cercanos, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los laboratorios con respecto al valor medio de grasa ($P=0.016$), el cual fue menor en el laboratorio 2. Considerando que la más notoria diferencia en la metodología fue el tratamiento de hidrólisis ácida que se le da a la muestra en el laboratorio 2, podría concluirse que la inclusión de este proceso conduce a una subestimación del contenido total de grasa, lo que demandaría correcciones en el proceso pues incluso se esperarí lo contrario.

En cuanto a humedad y materia seca, que son análisis complementarios, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los laboratorios ($P <$



0.001) con respecto a los valores medios de humedad y materia seca, el cual fueron menores en el laboratorio 2. Esta diferencia podría deberse a la diferencia en la metodología, que del laboratorio 2 incluye dos particularidades: el uso de arena de mar junto con la muestra y el uso del desecante de sílica gel en el desecador en lugar de cloruro de calcio. En particular, la adición de arena incrementa la superficie de contacto con el calor y la circulación del aire en la muestra, favoreciéndose así la evaporación, durante el tratamiento térmico (Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, 1995). Por lo cual es razonable asumir que la arena facilita y provee una mejor desecación y por ende valores de humedad menores. Por su parte, los valores de los coeficientes de variación fueron muy próximos entre laboratorios para los dos parámetros, humedad (*Laboratorio 1; CV inter-día = 0.3% & CV intra-día = 0.7%, laboratorio 2; CV inter-día = 0.4% & CV intra-día = 0.4%*) y materia seca (*Laboratorio 1; CV inter-día = 0.1% & CV intra-día = 0.1%, laboratorio 2; CV inter-día = 0.1% & CV intra-día = 0.05%*).

Durante el estudio inter-laboratorio, también se llevó un control de las temperaturas de trabajo de cada laboratorio, y se observaron relaciones positivas y negativas estadísticamente significativas entre la temperatura y algunos de los parámetros analizados en uno y/o ambos laboratorios que también pueden contribuir a las diferencias generales observadas. Se debe considerar además que el número de análisis es relativamente bajo y se necesitarían de un pool de datos más amplio para evidenciar con más exactitud la influencia de la temperatura en cada laboratorio.

En cuanto a la selección de harina de centeno como patrón secundario, deben resaltarse ciertas características tales como su baja propensión a la rancidez



lipídica por su bajo contenido de grasa, y su conservación más prolongada gracias a su contenido de humedad relativamente bajo (Rodríguez Gómez, 2009). Estas características permitirían que la harina de centeno tenga una vida media de aproximadamente tres años manteniendo su composición química homogénea, bajo adecuadas condiciones de conservación (lugar fresco y seco, no expuesto a luz solar).

Con fines comparativos, no se hallaron estudios similares en harina de centeno, pero sí de estudios inter-laboratorio en harina de trigo. Independientemente de los parámetros analizados y sus valores, su tratamiento estadístico fue similar al de este estudio. Además se resalta un aspecto importante y consistente en los estudios, que es el tratamiento o preparación de la muestra, donde se mencionan que se obtienen las muestras directamente de la molienda y como las bolsas de harina de un peso específico son luego colocadas en envases de polietileno y recubiertas en papel aluminio antes de ser enviados a los distintos laboratorios involucrados en los estudios (Portugal, Parcon, & Udarbe, 2013) (Instituto Nacional de Tecnología Industrial, 2014), lo cual hace referencia al cuidado que debe darse para conservar la muestra utilizada como patrón secundario. En el presente estudio no se pudo realizar eso ya que se tuvo que recurrir a un proveedor de harina de centeno quien garantizó que era fresca y proveniente del norte del país sin especificar la provincia. Esta información se constató solamente mediante las características organolépticas que fueron óptimas. En el estudio inter-laboratorio “*Proficiency Test on Total Dietary Fiber in Wheat Flour*” (Portugal, Parcon, & Udarbe, 2013), estuvieron involucrados 22 laboratorios, y en el caso particular de la humedad donde todos utilizaron el mismo método de secado, cuatro de los laboratorios



participantes obtuvieron valores bajos y otros dos reportaron valores elevados a lo cual los autores mencionan como posibles causas de estos valores a incorrectos ajustes en la temperatura de las estufas, balanzas analíticas y estufas sin calibrar, distribuciones desiguales de la muestra en las cápsulas o vasos para desecar y tiempos de secado y/o enfriamiento más largos o cortos de lo estipulado en el procedimiento. Estas atribuciones podrían ser aplicables en este estudio (en el parámetro de humedad en especial), pero al ser un estudio que involucró solo dos laboratorios y realizado por el mismo analista no existe mayor variación pero esto recalca la importancia de tener equipos correctamente calibrados y seguir estrictamente los procedimientos de los laboratorios pues descuidos en estos aspectos son los que hacen la diferencia al momento de obtener datos reales y reproducibles.



5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En este estudio se presenta a la harina de centeno como un alimento estable y apto para ser utilizado como patrón secundario para análisis proximal (macronutrientes). La vida útil que tenga este patrón secundario dependerá de manera directa de las condiciones de su conservación, que si son adecuadas (en un recipiente limpio, en un lugar fresco y seco aislado de la luz solar, y manipulado siempre con guantes) este debería permanecer estable por alrededor de tres años.

El uso de este patrón permitirá realizar periódicamente el control de calidad interna y externa de ambos laboratorios, incluyendo calibración de equipos o para la capacitación en las metodologías utilizadas en los laboratorios involucrados en el estudio. Esto se llevará a cabo con el uso apropiado de las gráficas control de Levey-Jennings y las reglas de Westgard que permiten detectar tendencias y resultados imprecisos de ensayos de una manera simple y que fueron elaboradas en este estudio a partir del análisis de 15 réplicas por parámetro en cada laboratorio. Además se espera que los laboratorios puedan llegar a reproducir los mismos resultados a través del tiempo, mejorando así la calidad de los resultados y maximizando la detección de errores y reduciendo su ocurrencia.

No está por demás resaltar que debido a las diferencias presentes entre los laboratorios, (equipos, metodologías, etc.) cada laboratorio debe utilizar su gráfica de control respectiva por parámetro que se analice, para una correcta interpretación.



5.2 Recomendaciones

- Se recomienda procurar la equiparación de las metodologías de los dos laboratorios participantes para así reducir la variación en los resultados obtenidos.
- Se recomienda ampliar el estudio pues mientras más laboratorios se incluyan en un estudio inter-laboratorio incrementará también la precisión del estudio comparativo y contribuirá a aclarar cualquier discrepancia que pudiese existir entre los laboratorios. Además de incrementar el número de determinaciones a 20 para mayor representación de la muestra.



REFERENCIAS

- Álvarez Calvo, J. L. (2008). *Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico*. Antioquia, Colombia: Universidad de Antioquia. Recuperado el 29 de Diciembre de 2015
- Amaral, R., & Lucas, R. (2003). Interlaboratory Comparison of Analytical Results a Measure of Quality Control. *The micro report*, 14(1), 4. Recuperado el 17 de Marzo de 2016, de http://www.micromeritics.com/Repository/Files/Microreport_v14_n1.pdf
- Bewoor, A. K., & Kulkarni, V. A. (2009). *Metrology & Measurement*. Nueva Delhi: McGraw-Hill. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015
- Campillo Seva, N. (Septiembre de 2011). *Equilibrios y volumetrías de precipitación*. Recuperado el 30 de Marzo de 2016, de Departamento de Química Analítica Facultad de Química Universidad de Murica: <http://ocw.um.es/ciencias/analisis-quimico/material-de-clase-1/tema-7.pdf>
- Colegio de bachilleres del estado de Sonora. (Agosto de 2007). *Análisis de los Alimentos 1*. (M. A. Navarro , Ed.) Recuperado el 26 de Noviembre de 2015, de <http://www.etpcba.com.ar/DocumentosDconsulta/ALIMENTOS-PROCESOS%20Y%20QU%C3%8DMICA/Manual%20de%20pr%C3%A1cticos%20en%20alimentos.pdf>
- Cooper , W. G. (Junio de 1997). *Sistemas de Control de Calidad Básico e Intermedio para el Laboratorio Clínico*. (N. Carey, Ed.) Recuperado el 28 de Diciembre de 2015, de http://www.qcnet.com/Portals/60/PDFs/BasicQCBklt_Sp_May11.pdf
- Cooper, G. (2008). *Basic Lessons in Laboratory Quality Control*. (B.-r. Laboratories, Ed.) Estados Unidos. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015
- Dandekar, S., & Rane, S. (2004). *Practicals and Viva in Medical Biochemistry* (1 ed.). New Delhi, India: Elsevier. Recuperado el 19 de Diciembre de 2015
- Ensminger, A., Konlande, J., & Robson, J. (1993). *Foods and Nutrition Encyclopedia* (Segunda ed., Vol. 1). Londres : CRC Press. Recuperado el 29 de Marzo de 2016
- Entidad Mexicana de Acreditación. (Julio de 2013). *Importancia de la Acreditación. Sector de alimentos*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2015, de http://www.imecca.com.mx/docs/Foro_Chi_Mex_Impo_Acreditacion_Ema.pdf



- Especialidades en Metrología Avanzada. (2011). *¿Qué es la Metrología?* Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de <http://www.metrologia-ema.com/pdf/metrologia-basica.pdf>
- Estridge, B. (2000). *Basic Medical Laboratory Techniques* (Cuarta ed.). Estados Unidos: Delmar. Recuperado el 3 de Enero de 2016
- European Medicines Agency. (14 de Diciembre de 2009). *Guidelines for the validation of analytical methods used in residue depletion studies*. Recuperado el 2 de Enero de 2016, de http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500040499.pdf
- Fernández Espina, C., & Mazziotta, D. (2005). *Gestión de la calidad en el laboratorio clínico* (1 ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Recuperado el 15 de Diciembre de 2015
- García, E., & Fernández, I. (28 de Junio de 2012). *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2015, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinaci%C3%B3n%20de%20humedad.pdf>
- García, E., & Fernández, I. (8 de Junio de 2013). *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte*. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de <https://riunet.upv.es/handle/10251/29832>
- Gimeno, A. (04 de Mayo de 2002). *Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015, de <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t342/p0.htm>
- Greenfield, H., & Southgate, D. (2006). *Datos de composición de alimentos* (2 ed.). (B. A. Burlingame , Ed.) Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 2 de Enero de 2016
- Hund, E., & Massart, D. L. (17 de Julio de 2000). *Inter-laboratory studies in analytical chemistry*. Recuperado el 2 de Enero de 2016, de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.541.7677&rep=rep1&type=pdf>
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. (29 de Junio de 1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994, Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o*



gasa. Recuperado el 25 de Abril de 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/116ssa14.html>

Instituto Nacional de Tecnología Industrial. (23 de Julio de 2014). *Determinación de parámetros de calidad en harinas de trigo*. Recuperado el 23 de Abril de 2016, de <https://www.inti.gob.ar/interlaboratorios/informes/2013/2013-Harinas.pdf>

Jones, D. B. (1941). *Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins*. Washington, DC: US Department of Agriculture. Recuperado el 17 de Marzo de 2016

Kenkel, J. (1992). *Analytical Chemistry Refresher Manual*. Washington D.C: CRC Press. Recuperado el 29 de Diciembre de 2015

Koehler, P., & Wieser, H. (2013). *Handbook on Sourdough Biotechnology*. (M. Gobbetti, & M. Gänzle, Edits.) Nueva York: Springer. Recuperado el 11 de Abril de 2016

Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca. (2010). *Manual de Análisis Proximal de Alimentos*. Cuenca. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015

Martínez, M. M., & Gómez, C. A. (2013). Calidad composicional e higiénica de la leche cruda recibida en industrias lácteas de Sucre, Colombia. *Bioteología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 93-100. Recuperado el 22 de Febrero de 2016

Massart, D. L., Vandeginste, B., Deming, S., Michotte, Y., & Kaufman, L. (2003). *Chemometrics* (1 ed., Vol. 2). (B. Vandeginste, & L. Kaufman, Edits.) Amsterdam: Elsevier. Recuperado el 3 de Enero de 2016

Mellado, M., & Matus, I. (2008). Antecedentes sobre el centeno en Chile y otros países. *Boletín INIA*(182), 39-40. Recuperado el 22 de Noviembre de 2015

Mellado, M., Matus, I., & Madariaga, R. (2008). Antecedentes sobre el centeno en Chile y otros países. *Boletín INIA*(182), 39-40. Recuperado el 22 de Noviembre de 2015, de <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR35864.pdf>

Moro Piñero, M. (2000). *Metrología: Introducción, Conceptos e Instrumentos*. Oviedo: Servicio de Publicaciones. Universidad de Oviedo. Recuperado el 22 de Noviembre de 2015

Myers, R. (2003). *The Basics of Chemistry*. Connecticut: Greenwood Press. Recuperado el 3 de Enero de 2016



- Nielsen, S. (2010). *Food Analysis Laboratory Manual*. Nueva York: Springer. Recuperado el 30 de Marzo de 2016
- Nollet, L. (2004). *Handbook of Food Analysis* (Vol. 1). Nueva York: Marcel Dekker, Inc. Recuperado el 05 de Abril de 2016
- OMS/FAO. (1999). *Los carbohidratos en la nutrición humana*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 29 de Diciembre de 2015
- Portugal, T. R., Parcon, M. V., & Udarbe, M. A. (Abril de 2013). Proficiency Test on Total Dietary Fiber in Wheat Flour. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 4(2), 82-86. Recuperado el 23 de Abril de 2016
- Preben, H., & Redgrave, F. (2008). *Metrology- in short* (Tercera ed.). Euramet. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015
- Rodríguez Gómez, J. M. (Diciembre de 2009). *Consecuencias higiénicas de la alteración*. Recuperado el 21 de Abril de 2016, de <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1107/1121>
- Santa Cruz Vera, C. M. (21 de Marzo de 2011). *Determinacion de cloruro de sodio en alimentos por metodo de mohr*. Recuperado el 12 de Marzo de 2016, de <http://es.scribd.com/doc/51209838/Determinacion-de-cloruro-de-sodio-en-alimentos-por-metodo-de-mohr#scribd>
- Sathe, A. (1999). *A First Course in Food Analysis*. Nueva Delhi: New Age International (P) Limited, Publishers. Recuperado el 28 de Marzo de 2016
- Shapiro, R. (1995). *Nutrition Labeling Handbook*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. Recuperado el 29 de Marzo de 2016
- The Nordic Council of Ministers. (1990). *Quality Assurance Principles for chemical food laboratories*. Copenhagen: Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), Espoo. Recuperado el 28 de Diciembre de 2015
- Universidad Nacional Autónoma de México. (21 de Agosto de 2011). *Análisis de alimentos. Fundamentos y Técnicas*. Recuperado el 3 de Enero de 2016, de <http://dspace.universia.net/handle/2024/1067>
- Vinagre, J. (2007). *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Recuperado el 3 de Enero de 2015, de Calidad de métodos analíticos: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah833s/ah833s.pdf>



Vives Corrons, J. L., & Aguilar Bascompte, J. L. (2006). *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología* (3 ed.). Barcelona, España: Elsevier. Recuperado el 18 de Diciembre de 2015

Yáñez Vera, M. (Marzo de 2009). *Instructivo uso de multireglas de Westgard*. Recuperado el 27 de Diciembre de 2015, de <http://www.ispch.cl/sites/default/files/IT%20Reglas%20Westgard.pdf>



ANEXOS



Anexo 1 Resultados individuales de análisis proximal y contenido de sal

Proteína bruta total (%)	Grasa total (%)	Humedad (%)	Materia seca (%)	Ceniza (%)	Carbohidratos Totales (%)	Contenido de sal (g / g de alimento)	Réplica	Día	Temperatura (°C)					Laboratorio	
									Proteína	Grasa	Humedad y materia seca	Ceniza	Sal		
10.43	1.59	13.23	86.77	1.78	72,97	*	1	1	19	18	17	17	*	L1	
10.27	1.49	13.27	86.73	1.73	73,24	*	2								
10.43	1.45	13.31	86.69	1.74	73,07	*	3								
10.28	1.63	13.14	86.86	1.83	73,12	*	1	2	19	19	18	17.5	*		
10.12	1.73	13.25	86.75	1.8	73,1	*	2								
10.28	1.71	13.19	86.81	1.85	72,97	*	3								
10.12	1.93	13	87	1.8	73,15	*	1	3	20	20	19	18	*		
10.27	1.8	13.17	86.83	1.76	73	*	2								
10.27	1.7	13.12	86.88	1.76	73,15	*	3								
10.13	2.04	13.38	86.62	1.79	72,66	*	1	4	19	20	19	18	*		
10.12	1.71	13.15	86.85	1.79	73,23	*	2								
10.28	1.83	13.15	86.85	1.8	72,94	*	3								
10.12	1.68	13.12	86.88	1.78	73,3	*	1	5	24	20	20	18.5	*		
10.28	1.94	13.25	86.75	1.78	72,75	*	2								
9.2	1.91	13.29	86.71	1.74	73,86	*	3								
9.72	1.63	12.02	87.98	1.74	74,89	0.27	1	1	24	21	21	21	22	L2	
10.12	1.69	12.14	87.86	1.76	74,29	0.27	2								
9.71	1.69	12.02	87.98	1.7	74,88	0.27	3								
11.83	1.73	12.1	87.9	1.78	72,56	0.27	1	2	24	21	21	21	24		
10.58	1.77	12.11	87.89	1.79	73,75	0.27	2								
12.21	1.74	12.11	87.89	1.77	72,17	0.27	3								
8.88	1.38	12.16	87.84	1.8	75,78	0.27	1	3	21	20	20	20	19		



7.34	1.56	12.2	87.8	1.78	77,12	0.25	2							
8.85	1.24	12.22	87.78	1.8	75,89	0.26	3							
9.67	1.46	12.1	87.9	1.85	74,92	0.26	1							
8.93	1.73	12.16	87.84	1.8	75,38	0.25	2	4	23	19	19	19	19	
8.87	1.69	12.04	87.96	1.79	75,61	0.25	3							
9.65	1.48	12.01	87.99	1.74	75,12	0.25	1							
8.82	1.57	12	88	1.76	75,85	0.23	2	5	24	22	22	22	21	
9.26	1.53	12.02	87.98	1.78	75,41	0.24	3							

Abreviaturas: *, no se realiza análisis; L1, laboratorio 1; L2, laboratorio2.



Anexo 2 Datos recolectados durante análisis proximal y determinación de contenido de sal

	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4			Día 5			
Réplica	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	L
Humedad y materia seca																
Fecha	16 de Noviembre de 2015			17 de Noviembre de 2015			18 de Noviembre de 2015			19 de Noviembre de 2015			20 de Noviembre de 2015			
Hora	11:00 AM			10:00 AM			10:00 AM			9:00 AM			9:00 AM			
Pc (g)	73.3329	74.1242	72.7644	73.344	74.131	72.7742	73.3373	74.1307	72.7659	73.3523	74.1205	72.7633	73.3362	74.136	72.7725	
P1(g)	2.2408	2.2892	2.2972	2.6386	2.637	2.6376	2.6187	2.6199	2.612	2.6266	2.6253	2.6289	2.6073	2.6927	2.6121	
Pc+M (g)	75.5737	76.4134	75.0616	75.983	76.768	75.4118	75.956	76.7506	75.3779	75.9789	76.7458	75.3922	75.9435	76.8287	75.3846	
(Pc+ M) final (g)	75.2772	76.1097	74.7558	75.636	76.418	75.064	75.6155	76.4055	75.0351	75.6274	76.4006	75.0464	75.6014	76.472	75.0374	
P2 (g)	1.9443	1.9855	1.9914	2.292	2.2877	2.2898	2.2782	2.2748	2.2692	2.2751	2.2801	2.2831	2.2652	2.336	2.2649	
% Materia seca	86.77	86.73	86.69	86.86	86.75	86.81	87.00	86.83	86.88	86.62	86.85	86.85	86.88	86.75	86.71	
% Humedad	13.23	13.27	13.31	13.14	13.25	13.19	13.00	13.17	13.12	13.38	13.15	13.15	13.12	13.25	13.29	L1
Pc (g)	52.7885	56.9124	52.4967	56.263	57.612	56.5315	49.5947	55.6605	55.1615	56.3553	58.2131	55.2413	49.7028	54.4587	53.4712	
P1(g)	5.0349	5.0175	5.0126	5.0066	5.0015	5.0013	5.0075	5.0023	5.0038	5.0084	5.0056	5.0055	5.0095	5.0057	5.0095	
Pc+ M (g)	57.8234	61.9299	57.5093	61.269	62.613	61.5328	54.6022	60.6628	60.1653	61.3637	63.2187	60.2468	54.7123	59.4644	58.4807	
(Pc+ M) final (g)	57.218	61.321	56.9066	60.663	62.008	60.9273	53.9934	60.0525	59.5536	60.7579	62.61	59.6439	54.1106	58.8637	57.8786	
P2 (g)	4.4295	4.4086	4.4099	4.4006	4.3957	4.3958	4.3987	4.392	4.3921	4.4026	4.3969	4.4026	4.4078	4.405	4.4074	
% Materia seca	87.98	87.86	87.98	87.90	87.89	84.89	87.84	87.80	87.78	87.90	87.84	87.96	87.99	88.00	87.98	
% Humedad	12.02	12.14	12.02	12.10	12.11	12.11	12.16	12.20	12.22	12.10	12.16	12.04	12.01	12.00	12.02	L2
Cenizas																



Fecha	19 de Noviembre de 2015			20 de Noviembre de 2015			21 de Noviembre de 2015			22 de Noviembre de 2015			23 de Noviembre de 2015			
Hora	8:30 AM			8:00 AM			9:30 AM			9:00 AM			9:00 AM			
P cris (g)	39.0041	33.4522	34.7198	39.004	33.452	34.7191	39.0034	33.4514	34.719	39.003	33.4522	34.7188	39.0032	33.4531	34.7195	
PM (g)	3.051	3.0037	3.0384	3.0027	3.0049	3.0119	3.0063	3.0039	3.0128	3.0122	3.0184	3.0031	3.0083	3.0048	3.0076	
Pcris+M (g)	42.0551	36.4559	37.7582	42.007	36.457	37.731	42.0097	36.4553	37.7318	42.0152	36.4706	37.7219	42.0115	36.4579	37.7271	
Pcris+C (g)	39.0585	33.5042	34.7728	39.059	33.506	34.7749	39.0574	33.5042	34.772	39.057	33.5063	34.7729	39.0568	33.5065	34.7718	
PC (g)	0.0544	0.052	0.053	0.0548	0.0541	0.0558	0.054	0.0528	0.053	0.054	0.0541	0.0541	0.0536	0.0534	0.0523	
% ceniza	1.78	1.73	1.74	1.83	1.80	1.85	1.80	1.76	1.76	1.79	1.79	1.80	1.78	1.78	1.74	L1
Fecha	16 de Noviembre de 2015			17 de Noviembre de 2015			18 de Noviembre de 2015			19 de Noviembre de 2015			20 de Noviembre de 2015			
Hora	11:00 AM			10:00 AM			10:00 AM			9:00 AM			9:00 AM			
P cris (g)	33.2942	36.7994	33.2579	33.293	36.799	35.0068	33.293	36.7991	35.0066	33.2926	36.7987	35.0055	39.0032	33.4516	34.719	
PM (g)	5.0172	5.0422	5.0142	5.0007	5.0005	5.0003	5.0004	5.001	5.0006	5.0079	5.0039	5.0034	5.0017	5.0012	5.0018	
Pcris+M (g)	38.3114	41.8416	38.2721	38.294	41.8	40.0071	38.2934	41.8001	40.0072	38.3005	41.8026	40.0089	44.0049	38.4528	39.7208	
Pcris+C (g)	33.3813	36.888	33.3432	33.382	36.889	35.0954	33.3832	36.8879	35.0965	33.3851	36.889	35.0952	39.0902	33.5396	34.8081	
PC (g)	0.0871	0.0886	0.0853	0.0888	0.0896	0.0886	0.0902	0.0888	0.0899	0.0925	0.0903	0.0897	0.08699	0.088	0.0891	
% ceniza	1.74	1.76	1.70	1.78	1.79	1.77	1.80	1.78	1.80	1.85	1.80	1.79	1.74	1.76	1.78	L2
Grasa total																
Fecha	26 de Noviembre de 2015			27 de Noviembre de 2015			28 de Noviembre de 2015			29 de Noviembre de 2015			30 de Noviembre de 2015			
Hora	11:30 AM			12:00 PM			1:00 PM			12:30 PM			1:00 PM			
Pm (g)	1.9154	1.9757	1.9657	2.0413	2.0469	2.0482	2.0605	2.0523	2.0619	2.2271	2.2451	2.2607	2.1337	2.2739	2.2192	
Po (g)	124.355	101.587	101.587	124.35	101.59	124.185	124.357	101.583	124.238	124.355	101.586	124.231	124.355	101.58	124.184	
P1 (g)	124.386	101.616	101.615	124.38	101.62	124.22	124.397	101.62	124.273	124.401	101.625	124.272	124.391	101.624	124.226	
% Grasa	1.59	1.49	1.45	1.63	1.73	1.71	1.93	1.80	1.70	2.04	1.71	1.83	1.68	1.94	1.91	L1
Fecha	16 de Noviembre de 2015			17 de Noviembre de 2015			18 de Noviembre de 2015			19 de Noviembre de 2015			20 de Noviembre de 2015			
Hora	11:00 AM			10:00 AM			10:00 AM			9:00 AM			9:00 AM			
Pm (g)	5.001	5.0005	5.0009	5.0866	5.0866	5.0871	5.0053	5.0019	5.0069	5.0011	5.0097	5.0058	5.0033	5.0108	5.0071	L2



Po (g)	106.465	106.834	116.987	117.06	115.01	113.698	116.996	106.314	106.831	117.058	116.986	113.696	115.002	106.313	106.83	
P1 (g)	106.546	106.918	117.072	117.14	115.1	113.786	117.065	106.392	106.893	117.131	117.073	113.78	115.076	106.392	106.907	
% Grasa	1.63	1.69	1.69	1.73	1.77	1.74	1.38	1.56	1.24	1.46	1.73	1.69	1.48	1.57	1.53	
Proteína bruta total																
Fecha	26 de Noviembre de 2015			27 de Noviembre de 2015			28 de Noviembre de 2015			29 de Noviembre de 2015			30 de Noviembre de 2015			
Hora	11:30 AM			12:00 PM			1:00 PM			12:30 PM			1:00 PM			
Pm	2.5004	2.5016	2.5011	2.5005	2.5013	2.5013	2.5015	2.5019	2.5019	2.5002	2.5014	2.501	2.501	2.5009	2.5006	
VOH (ml)	6.8	6.85	6.8	6.85	6.9	6.85	6.9	6.85	6.85	6.9	6.9	6.85	6.9	6.85	7.2	
NOH	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
F	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	
Di	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
VH (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
NH	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
KOH	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	0.9432	
K H	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	
% Proteína	10.43	10.27	10.43	10.28	10.12	10.28	10.12	10.27	10.27	10.13	10.12	10.28	10.12	10.28	9.20	L1
Fecha	2 de Noviembre de 2015			3 de Noviembre de 2015			4 de Noviembre de 2015			5 de Noviembre de 2015			6 de Noviembre de 2015			
Hora	11:00 AM			11:00 AM			12:00 PM			11:00 AM			11:00 AM			
PM (g)	0.2518	0.2521	0.2522	0.2501	0.2507	0.2507	0.2529	0.2503	0.2535	0.2532	0.2513	0.253	0.2538	0.2544	0.2533	
V HCl (ml)	1.2	1.25	1.2	1.45	1.3	1.5	1.1	0.9	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.15	
N HCl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
F	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	
% Proteína	9.72	10.12	9.71	11.83	10.58	12.21	8.88	7.34	8.85	9.67	8.93	8.87	9.65	8.82	9.26	L2
Contenido de Sal																
Fecha	2 de Noviembre de 2015			3 de Noviembre de 2015			4 de Noviembre de 2015			5 de Noviembre de 2015			6 de Noviembre de 2015			
Hora	11:00 AM			11:00 AM			12:00 PM			11:00 AM			11:00 AM			L2



PM (g)	5.1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
VB (ml)	0.1	0.1	0.1	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
V (ml)	2.45	2.45	2.45	2.45	2.5	2.45	2.45	2.3	2.35	2.35	2.25	2.3	2.25	2.1	2.2
Concentración AgNO ₃ (N)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
% Sal	0.2693	0.2747	0.2747	0.2689	0.2747	0.2689	0.2689	0.2513	0.2572	0.2572	0.2455	0.2513	0.2455	0.2280	0.2396
mmol Cl	0.2350	0.2350	0.2350	0.2300	0.2350	0.2300	0.2300	0.2150	0.2200	0.2200	0.2100	0.2150	0.2100	0.1950	0.2050
Masa Cl (mg)	8.3308	8.3308	8.3308	8.1535	8.3308	8.1535	8.1535	7.6218	7.7990	7.7990	7.4445	7.6218	7.4445	6.9128	7.2673
% Cloruros	0.1633	0.1666	0.1666	0.1631	0.1666	0.1631	0.1631	0.1524	0.1560	0.1560	0.1489	0.1524	0.1489	0.1383	0.1453
g Sal /100g producto	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.25	0.26	0.26	0.25	0.25	0.25	0.23	0.24

Abreviaturas: L, Laboratorio; L1, laboratorio 1; L2, laboratorio2; **Humedad y materia seca.** Pc; peso de cápsula, P1; Peso de la muestra, Pc+M; peso de la cápsula más el peso de la muestra; (Pc+M) final, peso final de la cápsula más el peso de la muestra; P2, peso de la muestra desecada. **Cenizas.** Pcris, Peso de crisol vacío; PM, peso de la muestra; Pcris+M, peso de crisol más la muestra; Pcris+C, peso de crisol más ceniza; PC, peso de ceniza. **Grasa total.** Pm, peso de la muestra; Po, peso del balón vacío; P1, Peso del balón pos extracción. **Proteína bruta total.** Pm, peso de la muestra; VOH, volumen de hidróxido de sodio; NOH, normalidad del hidróxido de sodio; F, factor de específico conversión de nitrógeno; Di, Factor de corrección de dilución; VH, volumen de ácido sulfúrico; NH, normalidad de ácido sulfúrico; KOH, constante del hidróxido de sodio; KOH, constante del hidróxido de sodio; V HCl, volumen del ácido clorhídrico; N HCl, normalidad del ácido clorhídrico. **Contenido de sal.** PM, peso de la muestra; VB, volumen de blanco; V, volumen de titulación.

**Anexo 3 Ejemplificación de cálculo de coeficiente de variación intra- e inter día****A) Coeficiente de Variación, inter-día.**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	
Replicado 1	10,43	10,28	10,12	10,13	10,12	
Replicado 2	10,27	10,12	10,27	10,12	10,28	
Replicado 3	10,43	10,28	10,27	10,28	9,2	
\bar{X}	10,38	10,23	10,22	10,18	9,87	(a)
Total \bar{X}	10,17					(b)

\bar{X} - total	0,20	0,05	0,05	0,00	-0,31	(c)
Absoluto	0,20	0,05	0,05	0,00	0,31	(d)
				SUMA	0,61	(e)
				n ensayos	5	
				DE	0,1227	(f)
				CV inter (%)	1,2	(g)

Abreviaturas: \bar{X} , media; n ensayos, número de ensayos; DE, desviación estándar; CV inter, coeficiente de variación inter-día.

Explicación:

- (a) Cálculo de la media de los tres replicados, por cada día.
- (b) Se calcula la media total, de todas las medias.
- (c) Se sustrae cada media con respecto a la media total.
- (d) Se convierten los valores obtenidos en el paso anterior, a valores absolutos.
- (e) Se suman todos los valores absolutos.
- (f) Se calcula la desviación estándar; se divide el valor de la suma de los valores absolutos para el número de ensayos.
- (g) Se calcula el coeficiente de variación inter-día; se divide la desviación estándar para la media total y este resultado se multiplica por 100.

B) Coeficiente de Variación, intra-día.



Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
10,43	10,28	10,12	10,13	10,12
10,27	10,12	10,27	10,12	10,28
10,43	10,28	10,27	10,28	9,2

(a)

(b)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	31,13	10,3766667	0,00853333
Día 2	3	30,68	10,2266667	0,00853333
Día 3	3	30,66	10,22	0,0075
Día 4	3	30,53	10,1766667	0,00803333
Día 5	3	29,6	9,86666667	0,33973333
		Media total	10,1733333	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,42126667	4	0,10531667	1,41427932	0,29827438	3,47804969
Dentro de los grupos	0,74466667	10	0,07446667			
Total	1,16593333	14				

DE pool	0,27	(c)
pool intra CV	2,68	(d)

Abreviaturas: DE pool, desviación estándar pool; pool intra CV, coeficiente de variación intra-día pool.

Explicación:

(a) En el programa Excel se realiza el Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de los grupos de datos (días de trabajo)

(b) La tabla de ANOVA presenta las medias de cada día del parámetro (en la columna "Promedio") y se procede a sacar la media total del parámetro.

(c) La tabla de ANOVA también presenta el "Análisis de Varianza" propiamente dicho, del cual se toma el "promedio de cuadrados" de la fila "dentro de



grupos”, para calcular la desviación estándar pool; se saca la raíz del “cuadrado de promedios”.

(d) Se calcula el coeficiente de variación intra-día pool, se divide la desviación estándar pool para media total y a este resultado se multiplica por 100.