



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**"Desarrollo de un Método por Electroforesis
Capilar para cuantificar seleno aminoácidos
en fluido y masa bacteriana ruminal"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ERIKA VARELA HERNANDEZ

ASESORAS:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ
DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Frika Varela

Hernández

FECHA: 13-OCTUBRE-2005

FIRMA: 



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Desarrollo de un Método por Electroforesis Capilar para cuantificar seleno aminoácidos en fluido y masa bacteriana ruminal"

que presenta la pasante: Erika Varela Hernández
con número de cuenta: 9951717-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 3 de Agosto de 2005

PRESIDENTE	QFB. Elia Granados Enriquez	
VOCAL	QFB. Martha Patricia Campos Peón	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Juan Chiu Chan	
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	

Agradecimientos

A Dios por las bendiciones que me ha dado, por mantener unida a mi familia y por darme la oportunidad de terminar este trabajo, que tanto trabajo me costo terminar. Por darme vida y salud para seguir adelante a pesar de todo. Porque nunca me has abandonado bajo ninguna circunstancia y porque sin tu ayuda jamás hubiese terminado los créditos de esta difícil y pesada carrera.

A mis padres por que me lo han dado todo y nunca me ha faltado nada.

A mi papito que me diste la oportunidad de solo estudiar, sin preocuparme por nada más. Por tu paciencia, ya que esta carrera y este momento se te hizo eterno. Por tus consejos y por solo ser mi papi, te dedico con todo mi amor este trabajo.

A mi mamita porque siempre me cuidas y te preocupa por mí, porque siempre me apoyaste para terminar mis estudios y la realización de este trabajo. Te quiero mucho y este trabajo también te lo dedico.

A mi hermanita Arianna por que me apoyaste y me prestaste la compu para hacer las correcciones de este trabajo y por que eres tu la más molestosa de todas.

A mi hermana Karina por que confiaste en mí y siempre estas conmigo apoyándome.

A la Dra. Alma Revilla que me dio la oportunidad de estar a su lado tanto tiempo, por tu ayuda y tu dedicación para la elaboración de esta tesis y aunque al principio, no confiabas mucho en mí; al final se logró una gran amistad. GRACIAS POR TODO.

A mis amigos en especial a Gaby Baeza que me aguantaste por mucho tiempo y porque siempre me ayudaste a estudiar cuando algo no entendía. Por siempre oírme y escuchar mis tonterías y por seguir siendo mi amiga.

A Rosa Martha que eres y seguirás siendo mi amiga a pesar de la distancia, te quiero mucho.

A Elivel gracias amiguita por tu paciencia, por escucharme siempre, por que sin ti los trámites de esta titulación hubiesen sido muy pesados para mí realizarlos, por la dedicación y el tiempo que has invertido; no tengo palabras para agradecerte, mil gracias.

A Maribel porque siempre crees en mí y me das ánimos para seguir adelante, échale ganas.

A Nefris porque siempre has sido mi amiga y estas conmigo, porque nuestra amistad nunca termine.

A la gente maravillosa que conocí en el laboratorio y que son grandes amigos: a Martha Ortega e Iván, gracias por ser mis amigos y ayudarme día a día a ser una mejor persona.

A Nancy y Luz porque también son mis amigas y no se olvidan de mí, por hacer mas llevadera la estancia aquí.

A Carla por ser una buena amiga y por tu apoyo, gracias.

A Oscar C. Gracias por brindarme la oportunidad de conocerte, por que me has ayudado a ser una mejor persona y por seguir dándome consejos. Échale muchas ganas a todo lo que desees lograr.

A Edgar gracias porque me ayudaste mucho con la realización de este trabajo y has estado conmigo en momentos muy difíciles, por el hecho de haber estado a mi lado.

A Gadiel por ser mi amigo y parte muy importante de mi vida, por ser amigo y confidente.

A la Profesora Guadalupe Rebollar por su amistad y tus consejos, nunca la olvidaré y gracias por tu amistad.

A la Dra. Raquel López por darme la oportunidad de entrar a este proyecto.

A todos los Profesores que dejaron una buena huella en mi formación profesional.

Al Dr. Eirén, Oscar del Razo, al Colegio de Post graduados de Chapingo por la ayuda y las facilidades brindadas, para la obtención de las muestras usadas en este trabajo.

Al proyecto PAPIC LN 212003, por el apoyo brindado para la realización y permanencia de este proyecto.

A toda mi Familia: tíos, primos y sobrinos, por ser parte importante de mi vida y por estar conmigo.

Y a todas aquellas personas que estuvieron conmigo durante la carrera y mi vida, sin omitir a nadie, les agradezco de antemano.

INDICE GENERAL

Contenido	Pág
Resumen	1
Abreviaturas y Símbolos	2
I.- Introducción	3
1.1.- Generalidades de la Electroforesis Capilar.	6
1.2.- Fundamentos de la Técnica.	8
1.3.- Factores que Afectan la Velocidad de Migración.	8
1.4.- Principios de la Separación Electroforética.	11
1.4.1 Movilidad Electroforética.	11
1.4.2 Movilidad Aparente y Tiempo de Migración	15
1.4.3 Factores que Afectan la Reproducibilidad del Tiempo de Migración.	16
1.4.4 Soluciones para Mejorar la Reproducibilidad del Tiempo de Migración.	16
1.5.- Separación de Aniones.	16
1.6.- Generalidades de la Validación.	19
1.7.- Características del Selenio.	20
1.7.1 Metabolismo del Selenio.	22
1.8.- Características de la Muestra.	23
1.9.- Hipótesis de Trabajo	26
1.10.- Justificación	27
2.- Objetivo General	28
2.1.-Objetivos Particulares	28
3.- Materiales y Métodos.	29
3.1.- Métodos	30
3.2.- Obtención de la Muestra de Líquido Ruminal	32
3.3.-Obtención de la Muestra de Masa Bacteriana Ruminal	33
4.- Resultados y Discusión de Resultados.	34
4.1.- Condiciones del Método	36
4.2.-Líquido Ruminal.	38
4.3.- Masa Bacteriana Ruminal.	42
4.4.- Validación del Método	45
4.5.- Seleno Cistina	47

INDICE GENERAL

Contenido	Pág
4.5.1 Linealidad del Sistema.	47
4.5.1.1 Precisión del Sistema.	54
4.5.2 Linealidad del Método.	55
4.5.3 Exactitud y Repetibilidad del Método.	61
4.5.4 Precisión y Reproducibilidad del Método.	62
4.6.- Seleno Metionina	65
4.6.1 Linealidad del Sistema.	65
4.6.1.1 Precisión del Sistema.	73
4.6.2 Linealidad del Método.	74
4.6.3 Exactitud y Repetibilidad del Método.	80
4.6.4 Precisión y Reproducibilidad del Método.	81
4.7.- Selenio	85
4.7.1 Linealidad del Sistema.	85
4.7.1.1 Precisión del Sistema.	93
4.7.2 Linealidad del Método	94
4.7.3 Exactitud y Repetibilidad del Método.	99
4.7.4 Precisión y Reproducibilidad del Método.	100
4.8.- Selenato	103
4.8.1 Linealidad del Sistema.	103
4.8.1.1 Precisión del Sistema.	111
4.8.2 Linealidad del Método	112
4.8.3 Exactitud y Repetibilidad del Método.	118
4.8.4 Precisión y Reproducibilidad del Método.	119
4.9.- Cuantificación de Seleno compuestos en el Líquido Ruminal.	122
4.10.- Cuantificación de Seleno compuestos en Masa.	
Bacteriana Ruminal.	122
4.11.- Cuantificación de Seleno compuestos en Líquido de Ruminal.	
para muestras del tratamiento con bolo de selenio.	123
4.12.- Cuantificación de Seleno compuestos en Masa Bacteriana	
Ruminal para muestras obtenidas del tratamiento con bolo de Selenio.	123
5.- Conclusiones	124
6.- Perspectivas	125
7.- Bibliografía	127

ÍNDICE TABLAS

Contenido	Pág
TABLA 1 Tiempo de Migración de los derivados de Selenio Orgánicos e Inorgánicos.	37
Tabla 2. Criterios de Aceptación considerados para la Validación del Método utilizado en este trabajo con la muestra de Líquido Ruminal.	46
Tabla 3. Preparación de la Curva de Calibración para Seleno Cistina.	47
Tabla 4. Resultados obtenidos de la Curva de Calibración realizada para la Linealidad del Sistema.	47
Tabla 5. Parámetros de Regresión Simple.	48
Tabla 6. ANOVA para Linealidad Simple con un nivel de confianza del 95%.	50
Tabla 7. Regresión del modelo Lineal para el Intercepto.	51
Tabla 8. Análisis de Residuales para Seleno Cistina.	51
Tabla 9. Análisis de Varianza para los Residuales.	52
Tabla 10. Parámetros estadísticos para el Error del Área Estimada y el error de la Concentración Estimada para Seleno Cistina.	54
Tabla 11. Datos estadísticos para evaluar la Precisión del Sistema de Seleno Cistina.	55
Tabla 12. Linealidad del Método de Seleno Cistina que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.	55
Tabla 13. Parámetros Estadísticos de la Concentración Recuperada para Seleno Cistina.	57
Tabla 14. ANOVA para Seleno Cistina Recuperado.	58
Tabla 15. Parámetros Estadísticos para el Intercepto en la Linealidad del Método de Seleno Cistina.	60
Tabla 16. Parámetros Estadísticos para el %Recobro de Linealidad del Método para Seleno Cistina.	60
Tabla 17. Resultados obtenidos de % Recobro para Exactitud y Repetibilidad de Seleno Cistina.	61
Tabla 18. Resultados obtenidos para determinar Exactitud y Repetibilidad para Seleno Cistina.	62

ÍNDICE TABLAS

Contenido	Pág
Tabla 19. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y Reproducibilidad para Seleno Cistina.	62
Tabla 20. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Seleno Cistina.	63
Tabla 21. Parámetros Estadísticos para determinar la Exactitud del Método para Seleno Cistina.	64
Tabla 22. Curva de Calibración para la Linealidad del Sistema de Seleno Metionina.	65
Tabla 23. Parámetros de Regresión Simple para Seleno Metionina.	66
Tabla 24. ANOVA para Linealidad Simple con un nivel de confianza del 95%.	68
Tabla 25. Regresión del modelo Lineal para el Intercepto para Seleno Metionina.	69
Tabla 26. Análisis de Residuales para Seleno Metionina.	70
Tabla 27. Análisis de Varianza para los Residuales para Seleno Metionina.	70
Tabla 28. Parámetros Estadísticos para el Error del Área Estimada y el Error de la Concentración Estimada para Seleno Metionina.	73
Tabla 29. Datos Estadísticos para evaluar la Precisión del Sistema de Seleno Metionina.	73
Tabla 30. Linealidad del Método de Seleno Metionina que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.	74
Tabla 31. Parámetros Estadísticos de Regresión para Seleno Metionina.	76
Tabla 32. ANOVA para Seleno Metionina Recuperado.	77
Tabla 33. Para el Intercepto en la Linealidad del Método de Seleno Metionina.	79
Tabla 34. Parámetros Estadísticos para el %Recobro de Linealidad del Método para Seleno Metionina.	79
Tabla 35. Resultados obtenidos de % Recobro para Exactitud y Repetibilidad de Seleno Metionina.	80
Tabla 36. Resultados obtenidos para determinar Exactitud y Repetibilidad para Seleno Metionina.	81

ÍNDICE TABLAS

Contenido	Pág
Tabla 37. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y Reproducibilidad para Seleno Metionina.	82
Tabla 38. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Seleno Metionina.	83
Tabla 39. Parámetros Estadísticos para determinar la Exactitud del Método para Seleno Metionina.	83
Tabla 40. Curva de Calibración para la Linealidad del Sistema de Selenito.	85
Tabla 41. Parámetros de Regresión Simple para Selenito.	86
Tabla 42. ANOVA para Linealidad Simple con un nivel de confianza del 95%.	88
Tabla 43. Regresión del modelo Lineal para el Intercepto para Selenito.	89
Tabla 44. Análisis de Residuales para Selenito.	90
Tabla 45. Análisis de Varianza para los Residuales.	90
Tabla 46. Parámetros Estadísticos para el Error del Área Estimada.	93
Tabla 47. Datos Estadísticos para evaluar la Precisión del Sistema de Selenito.	93
Tabla 48. Linealidad del Método de Selenito que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.	94
Tabla 49. Parámetros Estadísticos de Regresión para Selenito.	95
Tabla 50. ANOVA para Selenito Recuperado.	96
Tabla 51. Resultados de los parámetros para el intercepto en la Linealidad del Método de Selenito.	98
Tabla 52. Parámetros Estadísticos para el %Recobro de Linealidad del Método para Selenito.	98
Tabla 53. Resultados obtenidos de % Recobro para Exactitud y Repetibilidad de Selenito.	99
Tabla 54. Resultados obtenidos para determinar Exactitud y Repetibilidad para Selenito.	100
Tabla 55. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y Reproducibilidad para Selenito.	100

ÍNDICE TABLAS

Contenido	Pág
Tabla 56. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Selenito.	101
Tabla 57. Parámetros Estadísticos para determinar la Exactitud del Método para Selenito.	102
Tabla 58. Preparación de la Curva de Calibración para Selenato.	103
Tabla 59. Curva de Calibración realizada para la Linealidad del Sistema.	103
Tabla 60. Parámetros de Regresión Simple para Selenato.	105
Tabla 61. ANOVA para Linealidad Simple de Selenato con un nivel de confianza del 95%.	107
Tabla 62. Regresión del modelo Lineal para el Intercepto para Selenato.	107
Tabla 63. Análisis de Residuales para la Linealidad del Sistema de Selenato.	108
Tabla 64. Análisis de Varianza para los Residuales para Selenato.	109
Tabla 65. Parámetros Estadísticos para el Error del Área Estimada y el Error de la Concentración Estimada para Selenato.	111
Tabla 66. Datos Estadísticos para evaluar la Precisión del Sistema de Selenato.	112
Tabla 67. Linealidad del Método de Selenato que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.	112
Tabla 68. Parámetros Estadísticos de Regresión para Selenato.	114
Tabla 69. ANOVA para Selenato Recuperado.	115
Tabla 70. Para el Intercepto en la Linealidad del Método de Selenato.	117
Tabla 71. Parámetros Estadísticos para el %Recobro de Linealidad del Método para Selenato.	117
Tabla 72. Resultados obtenidos de % Recobro para Exactitud y Repetibilidad de Selenato.	118
Tabla 73. Resultados obtenidos para determinar Exactitud y Repetibilidad para Selenato.	119
Tabla 74. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y Reproducibilidad para Selenato.	119
Tabla 75. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Selenato.	120

ÍNDICE TABLAS

Contenido	Pág
Tabla 76. Parámetros Estadísticos para determinar la Exactitud del Método para Selenato.	120
Tabla 77. Resultados obtenidos de Límite de Cuantificación y Límite de Detección.	121
Tabla 78. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Líquido Ruminal de rumiantes sin tratamiento con bolos de Selenio.	122
Tabla 79. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Masa Bacteriana de rumiantes sin tratamiento con bolos de selenio.	122
Tabla 80. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Líquido Ruminal de rumiantes tratados con bolos de Selenio.	123
Tabla 81. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Masa Bacteriana de rumiantes tratados con bolos de Selenio.	123

ÍNDICE GRAFICAS

Contenido	Pág
Gráfico 1. Relación Lineal del Área contra la Concentración para Seleno Cistina.	48
Gráfico 2. Muestra la tendencia de los residuales.	49
Gráfico 3. Comportamiento de los valores observados con los Estimados para determinar la Linealidad de Seleno Cistina.	49
Gráfico 4. Análisis de residuales de Seleno Cistina.	52
Gráfico 5. Correlación entre las variables en estudio para Seleno Cistina.	53
Gráfico 6. Correlación entre el Error de la Concentración Estimada y el Error del Área Estimada.	53
Gráfico 7. Linealidad entre la Concentración Recuperada y la Concentración Adicionada.	56
Gráfico 8. Residuales para Seleno Cistina en la Linealidad del Método.	58
Gráfico 9. Concentración Recuperada para Seleno Cistina.	59
Gráfico 10. Comparación de resultados obtenidos de Día y Analista para Seleno Cistina con Intervalo de Confianza del 95%.	64
Gráfico 11. Relación Lineal del Área contra la Concentración para Seleno Metionina.	66
Gráfico 12. Muestra la tendencia de los residuales para Seleno Metionina.	67
Gráfico 13. Comportamiento de los valores observados con los Estimados para determinar la Linealidad de Seleno Metionina.	67
Gráfico 14. Análisis de Residuales para Seleno Metionina.	71
Gráfico 15. Correlación entre las variables en estudio para Seleno Metionina.	71
Gráfico 16. Correlación entre el Error de la Concentración Estimada y el Error del Área Estimada para Seleno Metionina.	72
Gráfico 17. Linealidad entre la Concentración Recuperada y la Concentración Adicionada.	75
Gráfico 18. Residuales para Seleno Metionina en la Linealidad del Método.	77
Gráfico 19. Concentración Recuperada de los observados y los Estimados para Seleno Metionina.	78

ÍNDICE GRÁFICAS

Contenido	Pág
Gráfico 20. Comparación de resultados obtenidos de Día y Analista para Seleno Metionina con Intervalo de Confianza del 95%.	84
Gráfico 21. Relación Lineal del Área contra la Concentración para Selenito.	86
Gráfico 22. Muestra la tendencia de los residuales para Selenito.	87
Gráfico 23. Comportamiento de los valores observados con los Estimados para determinar la Linealidad de Selenito.	87
Gráfico 24. Análisis de Residuales para Selenito.	91
Gráfico 25. Correlación entre las variables en estudio de Selenito.	91
Gráfico 26. Correlación entre el Error de la Concentración Estimada.	92
Gráfico 27. Linealidad entre la Concentración Recuperada y la Concentración Adicionada.	95
Gráfico 28. Residuales para Selenito en la Linealidad del Método.	97
Gráfico 29. Concentración Recuperada de los observados y los Estimados para Selenito.	97
Gráfico 30. Comparación de resultados obtenidos de Día y Analista para Selenito con Intervalo de Confianza del 95%.	102
Gráfico 31. Relación Lineal del Área contra la Concentración para Selenato.	104
Gráfico 32. Tendencia de los residuales para Selenato.	105
Gráfico 33. Comportamiento de los valores observados con los Estimados para determinar la Linealidad de Selenato.	106
Gráfico 34. Análisis de residuales para Selenato.	109
Gráfico 35. Correlación entre las variables en estudio para Selenato.	110
Gráfico 36. Correlación entre el Error de la Concentración Estimada y el Error del Área Estimada para Selenato.	110
Gráfico 37. Linealidad entre la Concentración Recuperada y la Concentración Adicionada.	113
Gráfico 38. Residuales para Selenato en la Linealidad del Método.	115
Gráfico 39. Concentración Recuperada para Selenato.	116
Gráfico 40. Comparación de resultados obtenidos de Día y Analista	

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ECAR	Electroforesis Capilar de Alta Resolución
FEO	Flujo Electroosmótico
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
CMC	Concentración Micelar Crítica
Se	Selenio
Na	Sodio
K	Potasio
°C	Grados Centígrados
psi	Unidades de Presión
Se-cis	Seleno Cistina
Se-met	Seleno Metionina
Se-cist	Seleno Cisteína
Na ₂ B ₄ O ₇	Borato de Sodio, 10-Hidrato
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sodio, Monobásico, Monohidrato
nm	Nano metros
min.	Minutos
SeO ₃	Selenito
SeO ₄	Selenato
rpm.	revoluciones por minutos
ppm.	Partes por millón.
µl	Micro litros
%	Porcentaje
C.V	Coefficiente de Variación
F _{cal}	F calculada
T _{cal}	T calculada
T _{tab}	T tablas
g.l.	Grados de libertad
Prob.	Probabilidad
L.I.C	Límite Inferior de Confianza
L.S.C	Límite Superior de Confianza
Conc.	Concentración
r ²	Coefficiente de determinación
r	Coefficiente de correlación
D.W	Durbin-Watson
Recup.	Recuperada
Adic.	Adicionada.
H ₀	Hipótesis Nula
H _A	Hipótesis Alternativa.
S.C	Suma de Cuadrados
C.M	Cuadrados Medios

RESUMEN

El Selenio es esencial para algunas funciones corporales, tales como el crecimiento, la reproducción, la prevención de enfermedades y la protección de la integridad de los tejidos. Además de que es una parte esencial de la enzima peroxidasa de glutatión (GSH-Px); la cuál protege las membranas celulares y subcelulares contra los daños por oxidación.

Por lo tanto la deficiencia de Selenio acarrea problemas de crecimiento reducido y distrofia muscular de carácter nutricional (conocida como enfermedad del músculo blanco), además de una baja tasa de reproducción en animales adultos.

Debido a la importancia de dicho problema en el ganado. En este trabajo se decidió trabajar con dos muestras, el líquido ruminal y la masa bacteriana ruminal; las cuales nos permitirían cuantificar la cantidad de selenio orgánico e inorgánico que se presentan en ellas por medio de una técnica analítica llamada electroforesis capilar.

Para lograr este objetivo se tuvieron que obtener las muestras de los animales y posteriormente se prosiguió a encontrar un pretratamiento adecuado que permitiera analizar las muestras por medio de la técnica antes mencionada y así lograr la cuantificación de los seleno compuestos presentes.

El análisis de las muestras, por electroforesis capilar, se llevo a cabo bajo las condiciones del método planteado en el trabajo previo de la referencia 1. Debido a que las condiciones del método utilizado ya estaban preestablecidas se llevo a cabo la validación de este para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en este trabajo.

1.- INTRODUCCION

El Selenio esta ubicado como uno de los micro-nutrientes esenciales para los animales y los humanos según estudios bioquímicos.

Además el Selenio es un elemento que se encuentra en forma constante, pero en pequeñas cantidades en los tejidos animales, formando parte de sistemas enzimáticos muy importantes, logrando que sea un elemento indispensables para el funcionamiento normal de músculos, corazón, hígado, riñones, páncreas y quizás otros órganos.⁽¹⁾

Este elemento también forma parte de varios procesos metabólicos y que son indispensables para el desarrollo normal del cerebro, además, es parte importante para prevenir la enfermedad del músculo blanco (distrofia muscular nutricional), que provoca la muerte en rumiantes, tiene influencia sobre el aspecto reproductivo y resistencia a enfermedades provocadas por el estrés.

En los rumiantes, bajo condiciones de pastoreo, es indispensable el suministro de Selenio, cuando éste es deficiente, ya que se mejora la producción de calostro y leche, reduciéndose los problemas reproductivos y sanitarios, principalmente.⁽⁴⁾

El Selenio es un elemento traza esencial para los humanos y los animales, ya que es incorporado dentro de la molécula de la enzima glutatión peroxidasa, la cual, es vital para proteger a los glóbulos rojos y membranas celulares contra las reacciones indeseables con peróxidos solubles que se acumulan en los tejidos. También se sabe que disminuye la incidencia de metritis* del ganado y mejora la respuesta inmune a ovejas.

Las tierras deficientes de Selenio, las prácticas modernas de fertilización y la expansión de las lluvias ácidas han reducido la cantidad de Selenio en los alimentos. Por ello es necesario hacer uso de suplementos minerales que cubran los requerimientos de los animales para un mantenimiento y producción animal adecuados.⁽⁴⁾

*metritis: inflamación de la matriz.

Por lo anterior se hace necesario, el desarrollo de bolos de Selenio como un complemento alimenticio, que permita mejorar los niveles de este mineral en animales, que presenten deficiencia del mismo. Para corroborar que dicho complemento alimenticio esta cumpliendo con su objetivo es indispensable desarrollar una técnica analítica que permita cuantificar la cantidad de Selenio tanto orgánico como inorgánico presente en el rumen del animal.⁽⁴⁾

Para lograr lo anterior se han utilizado diferentes técnicas de separación, útiles para los compuestos de Selenio; como las técnicas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución entre las que se encuentran: Cromatografía de Cambio de Aniones, Cromatografía por Cambio de Cationes, Cromatografía Fase Inversa, Cromatografía de Pares Iónicos. Aunque recientemente se han utilizado algunas técnicas nuevas por Electroforesis Capilar, como la utilizada en este trabajo.

La técnica de Electroforesis Capilar se ha aplicado ya en la especiación y en la cuantificación de compuestos orgánicos e inorgánicos de varios elementos como Arsénico, Estaño, Cromo, entre otros, además del Selenio, tanto en agua, tierra, suplementos alimenticios y muestras biológicas.⁽¹⁾

Además, existen trabajos previos en los que se reportan métodos de separación de compuestos de Selenio mediante Electroforesis Capilar por diferentes autores como Gilon, Zheng, Casiot y Hagege; aunque con límites de detección muy altos o con tiempos de análisis muy largos.^(1,7)

La ventaja de esta técnica con respecto a otras como las de HPLC, reside en el corto tiempo de análisis, las pequeñas cantidades de muestras que se utiliza, la alta eficiencia de la separación, además de la disponibilidad de equipos automatizados comerciales y los bajos costos en consumibles.

En este trabajo se empleo un método desarrollado en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos (2004) que permite el análisis de cuatro compuestos de Selenio:

Seleno cistina, Seleno metionina, Selenato (SeO_4) y Selenito (SeO_3) bajo un tiempo de análisis corto (3 min) y límites de detección más bajos que los que proponen los autores ya antes mencionados.^[1]

Cuando se tiene interés de medir un componente en una muestra, es necesario contar con un método analítico para lograrlo. Una vez desarrollada la metodología es necesario que este cumpla con ciertos parámetros de calidad. Esto se logra con la validación del método; dicha validación proporciona a quien aplica la metodología, la seguridad de que al utilizar dicho método va obtener resultados confiables.

La Validación de métodos analíticos se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas y para lo que fue diseñado. En las guías de Validación se encuentran establecidos los parámetros que deben de cubrir los métodos desarrollados dependiendo de la muestra y del equipo utilizado para su evaluación.^[2]

En el presente trabajo se evaluó la eficacia del método desarrollado por Electroforesis Capilar para determinar Seleno Cistina, Seleno Metionina, Selenato (SeO_4) y Selenito (SeO_3); en muestras biológicas como es el Líquido Ruminal, la Masa Bacteriana Ruminal y por último se realizó la Validación del método a fin de asegurar la confiabilidad del mismo.

1.1.-Generalidades de la Electroforesis Capilar.

La Electroforesis Capilar es una técnica analítica que ha ido evolucionando y mejorando en las últimas tres décadas. En la actualidad se cuenta con equipos automatizados que pueden realizar diferentes modalidades o tipos de Electroforesis Capilar siendo la más simple de ellas la denominada Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) o en ocasiones llamada Electroforesis Capilar de Alta Resolución (ECAR o HPCE).^(1,16)

En esta técnica la separación depende de las diferencias entre las propiedades eléctricas de los analitos al estar en un medio conductor de electricidad y bajo la influencia de un campo eléctrico.

La electroforesis capilar consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies cargadas o neutras, que se separan en función ya sea de su carga o de su movilidad iónica, en el medio en el que se encuentren, bajo la influencia de un campo eléctrico.⁽¹²⁾

En la Figura 1, se muestra como es la migración de cationes, aniones y moléculas neutras en el interior del capilar bajo la acción del campo eléctrico.

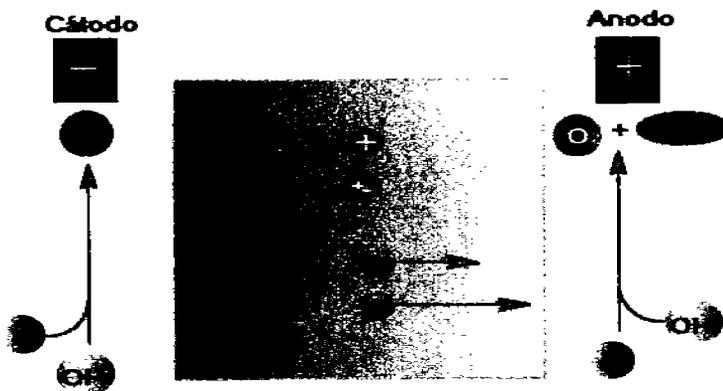


Figura 1. Migración de iones y reacciones asociadas a la separación Electroforesica.⁽¹²⁾

Además de la Migración de iones en el interior del capilar es importante mencionar cuales son las partes de las que consiste básicamente el equipo de Electroforesis Capilar, como se muestra en la Figura 2.

- Electrodo (ánodo y cátodo)
- Capilar (compartimento de la separación, comúnmente de sílice fundida con recubrimiento de polímero)
- Fuente de poder
- Deposito de buffer o electrolito de soporte
- Sistema de enfriamiento capilar
- Sistema de inyección
- Detector
- Computadora

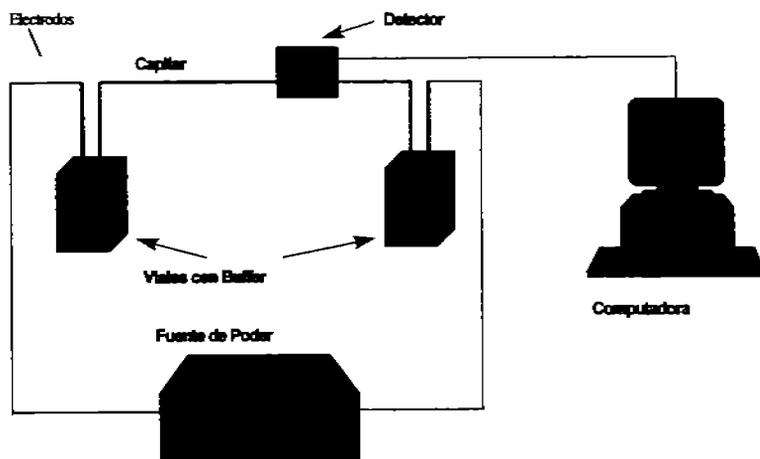


Figura 2. Partes del equipo de Electroforesis Capilar.

1.2 Fundamento de la Técnica

Importantes moléculas de estudio en biología poseen grupos ionizables como es el caso de los aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos; dicha cualidad permite que se tengan en disolución en forma de especies con carga eléctrica (cationes o aniones).^{11,12}

Dichos cationes migraran hacia el cátodo(-) y los aniones migraran hacia el ánodo(+) con una velocidad que depende del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que migran y el medio circundante, que son principales fuerzas de fricción electrostáticas.^{11,12}

Las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidads de los analitos. La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y tamaño del analito así como la viscosidad del medio.

Lo que también puede influir en la carga del analito son las propiedades del disolvente (fuerza iónica, pH y la constante dieléctrica); en el caso de moléculas grandes influye la forma y tamaño hidrodinámico.

1.3 Factores que afectan la velocidad de migración del analito

- En la Muestra, la naturaleza de los compuestos que poseen carga eléctrica afecta su velocidad de migración de la siguiente forma:
 - **Tamaño:** Cuando las moléculas son grandes la velocidad de migración es menor, ya que se incrementan las fuerzas de fricción y electrostáticas que son ejercidas por el medio circundante.
 - **Carga:** Cuando la carga del analito se incrementa la velocidad de migración también aumenta; cabe mencionar, que la magnitud de la carga depende del pH.
 - **Forma:** Las moléculas que poseen tamaños similares pero con diferentes formas tienen distintas características migratorias por los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas.^{11,12}

- **El Medio de Soporte:** el cual es el material con que esta hecho el capilar; ya que la composición específica del medio proporciona varios efectos sobre la velocidad de migración de un compuesto. Por lo que la selección de un medio de soporte determinado depende del tipo de muestra que hay que analizar.
En este trabajo se utilizo como medio de soporte, un capilar hecho con sílice fundida, ya que son químicos, eléctricamente inertes, flexibles y económicos.^(12,14)
- **Electroósmosis:** este es el resultado de una carga relativa que se produce entre las moléculas del agua del buffer y de la superficie del medio de soporte; ya que cuando el tubo capilar de separación es llenado con el electrolito, se forma una doble capa en la pared interna de la superficie del capilar, debido a los grupos ionizables del material de la pared o a los iones adsorbidos sobre la pared del capilar.
- **Adsorción:** esta puede también disminuir la velocidad de migración, ya que es la retención de moléculas de la muestra en el medio de soporte.
- **Electrolito Soporte:** este es el buffer o el sistema amortiguador que se utiliza. El buffer determina y estabiliza el pH del medio de soporte, lo cual afecta la velocidad de migración de los compuestos.
- **Concentración:** Conforme aumente la fuerza iónica del buffer, la proporción de corriente conducida por este, también crece por lo que la conducción de corriente en la muestra disminuye, reduciendo la velocidad de migración.
- **pH:** El pH en compuestos orgánicos determina la magnitud de la ionización de los ácidos orgánicos, por lo que aumenta con el pH, mientras que para las bases orgánicas pasa lo contrario por lo que la velocidad de migración depende del pH. En el caso de los aminoácidos como en este casos producen ambos efectos debido a sus propiedades básicas y ácidas.

- Selección del buffer: Debido a la sensibilidad que presenta el flujo electroosmótico al pH, se requiere el uso de un buffer que pueda mantener un pH constante; por lo que es importante que este electrolito de soporte, utilizado en la Electroforesis Capilar cumpla con las siguientes características:
 - ❖ Que tenga buena capacidad de amortiguamiento en el rango seleccionado.
 - ❖ Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.
 - ❖ Que posea baja absorbancia a la longitud de onda de detección.

- Intensidad de Corriente: La velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente, debido a que entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra.

- Voltaje: Este es el que regula la corriente, por lo que la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial existente en el medio de soporte. Los voltajes altos se utilizan, para la separación de compuestos de bajo peso molecular. Con determinadas condiciones de voltaje, todos los analitos son transportados hacia el cátodo por influencia del flujo electroosmótico, pero la rapidez con la cual migran las moléculas depende de su carga.

- Resistencia: La velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia, esta depende del tipo, el tamaño del medio de soporte y de la fuerza iónica del búfer. La resistencia aumenta con la longitud del medio de soporte y disminuye con la anchura y con el aumento de concentración iónica del búfer.^(12,14)

1.4 PRINCIPIOS DE LA SEPARACION ELECTROFORÉTICA

• 1.4.1 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico.

Cuando ningún flujo electroosmótico está presente, la velocidad de un analito está dada por la siguiente ecuación:

$$v = \mu \times E$$

Donde:

- v = la velocidad del analito
- μ = la movilidad electroforética
- E = campo eléctrico

El campo eléctrico es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm). La movilidad electroforética depende de la especie iónica, tamaño, carga, temperatura, naturaleza y concentración del analito.^(1,12,14)

Para explicar la movilidad de los analitos se explica con la siguiente ecuación:

$$\mu = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right)$$

Donde:

- μ = Movilidad electroforética del analito
- q = carga del analito
- η = viscosidad de la solución.
- r = radio molecular

En la Electroforesis Capilar es fundamental conocer y en ocasiones manipular el Flujo Electroosmótico (FEO); este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando esta entra en contacto con una superficie sólida cargada. En este caso en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito de soporte, la superficie del sólido esta con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol a pH mayores de 5 y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica (figura 3).⁽¹²⁾



Figura 3. Pared del capilar con la disociación de los grupos silanol.⁽¹²⁾

Dichos iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol H^+) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando solvente con ellos dada su solvatación.¹⁴

El Flujo Electroosmótico se explica mejor en la Figura 4:

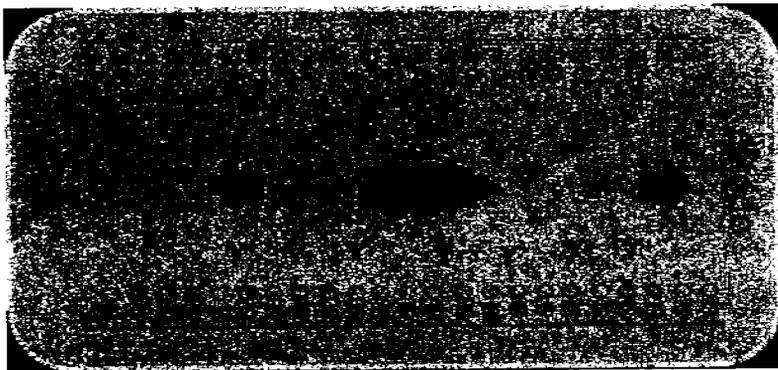


Figura 4. Flujo Electroosmótico en condiciones normales.

El FEO puede provocar el movimiento a todas las especies, prescindiendo de la carga, en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar esta cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo.

Cabe señalar que el FEO puede modificar la migración de los iones, por lo que los cationes son impulsados por el FEO a mayor velocidad, mientras que si la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. Cabe señalar que una especie no cargada se moverá a la velocidad del flujo Electroosmótico (Figura 5).

Los cationes migran más rápidamente hacia el cátodo porque el FEO va en la misma dirección, mientras los neutros son acarreados a la velocidad del FEO pero no logran ser separados, mientras que los aniones migran más lento ya que ellos son atraídos hacia el ánodo pero son acarreados por el FEO hacia el cátodo.^(1,12,14)

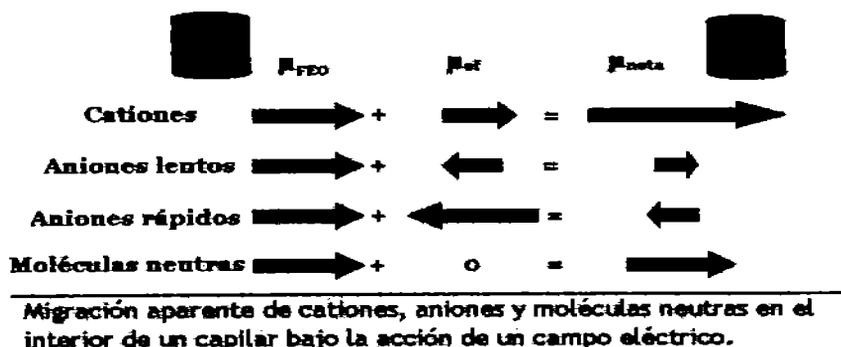


Figura 5. Migración de cationes, aniones y moléculas neutras en el interior del capilar bajo la influencia del FEO

El FEO puede ser alterado por los siguientes factores:

- o La modificación química de la pared capilar, como una alternativa para limitar la adsorción del analito.
- o El ajuste del pH del electrolito soporte o búfer.
- o Concentración del búfer.
- o Adición de surfactantes
- o La adición de solventes orgánicos, los cuales provocan la disminución de la velocidad FEO.
- o La adición de selectores quirales.^[12]

1.4.2 MOVILIDAD APARENTE Y TIEMPO DE MIGRACIÓN

Se le llama tiempo de migración al tiempo que requiere el analito para llegar al punto de detección. El tiempo de migración esta dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración.

Con la siguiente ecuación; el tiempo de migración, así como otros parámetros experimentales pueden ser utilizados para calcular la movilidad aparente del analito.

$$\mu_o = \left(\frac{l}{tE} \right) \times \left(\frac{IL}{tV} \right)$$

Donde; $\mu_o = \mu_o + \mu_{eo}$

V= voltaje aplicado

l= longitud efectiva del capilar (al detector)

L= Longitud total del capilar

t= tiempo de migración

E= campo Eléctrico

Cuando esta presente el FEO la movilidad medida se le conoce como movilidad aparente, μ_o .

La movilidad efectiva μ_o , es la movilidad del analito y es independiente de las condiciones experimentales, esta se puede medir a partir de la movilidad aparente.

La longitud efectiva es la distancia entre el punto de inyección y el punto de detección, esto para detecciones espectrofotométricas sobre el capilar; esta longitud es por lo regular de 5 a 10 cm menos a la longitud total. ⁽¹²⁾

1.4.3 Factores que afectan la reproducibilidad del Tiempo de Migración.

- Cambios en la temperatura, esto puede originar cambios en la viscosidad y el FEO.
- Adsorción a las paredes del capilar el efecto que origina son cambios en el FEO, causados por el búfer, aditivos o adsorción de la muestra.
- Cambios en la composición del búfer, lo cuál origina, cambios de pH debido a la electrólisis, evaporación del búfer, cambios de corriente o voltaje.
- Diferente carga de los grupos silanol, lo cuál es causada por el acondicionamiento del capilar, empleando un bajo o alto pH del búfer, originando así un FEO inestable.
- Bajo nivel de búfer en el vial, provoca flujo laminar no reproducible.
- Variaciones del Voltaje origina cambios proporcionales en el tiempo de migración.⁽¹²⁾

1.4.4 Soluciones para mejorar la reproducibilidad del Tiempo de Migración.

- Termorreguladores Capilares
- Recubrir el capilar permanentemente o dinámicamente
- Usar viales de separación para coleccionar las soluciones
- Lavar primero el capilar con el búfer de separación.
- Evitar las diferencias de los pH's.
- Dejar tiempo suficiente de equilibrio.
- Medir el FEO y normalizar si es necesario.
- Mantener el mismo nivel de líquido en el vial.
- Utilizar un estándar interno ⁽¹²⁾

1.5 Separación de aniones

La separación de aniones se puede llevar por medio de dos estrategias: 1) a pH bajo con voltajes negativos a fin de tener al ánodo del lado del detector o 2) empleando un pH alcalino y modificando el sentido del flujo electroosmótico con la adición de un surfactante catiónico.

En este caso se utilizó la Electroforesis Capilar de Zona con la adición de un surfactante catiónico, en este caso CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio), ayudando así a la separación de especies en su forma aniónica en pH alcalino y voltaje negativo.

Los surfactantes se presentan como monómeros a bajas concentraciones; por lo regular las micelas se forman usualmente en disoluciones acuosas cuando la concentración de una especie iónica que tiene una cola de hidrocarburo de cadena larga, se aumenta hasta su concentración micelar crítica (CMC). Por lo que es necesario mencionar que en este trabajo la concentración de surfactante empleada es menor a la Concentración Micelar Crítica para evitar la formación de micelas.^(1,12,18)

El objetivo de la adición de un surfactante catiónico a bajas concentraciones es que permite disminuir o bien revertir el sentido del flujo Electroosmótico; normalmente este flujo se mueve desde el ánodo al cátodo y al momento de adicionar el surfactante el flujo electroosmótico ahora se dirige de cátodo a ánodo.

Para revertir el flujo Electroosmótico se necesita que la carga de la pared sea positiva, por lo que para lograrlo se requiere adicionar la cantidad adecuada del surfactante catiónico, que es siempre menor a su CMC.

Al adicionar el surfactante catiónico a pH alcalino, este interactúa con las cargas negativas de los grupos silanol y al tener un cierto exceso, interactúa consigo mismo y forma una doble capa con carga global positiva modificando así la pared del capilar y logrando con ello que el flujo electroosmótico viaje en la misma dirección que los aniones.^(1,12,18)

En la Figura 6, se observa como se invierte el flujo Electroosmótico con la adición del surfactante:

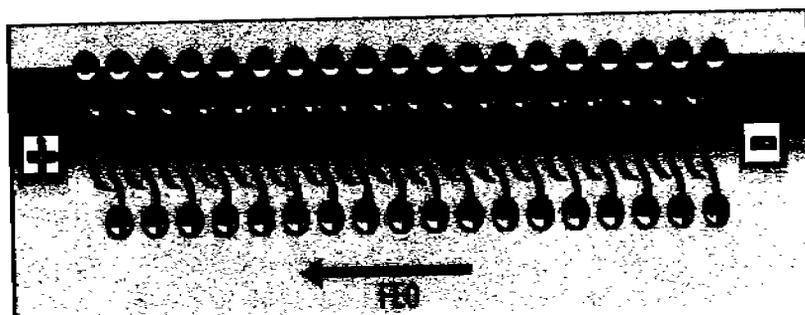


Figura 6. Flujo Electroosmótico revertido por la adición de un surfactante

Siendo que el flujo electroosmótico se mueve ahora hacia el ánodo, es necesario aplicar un voltaje negativo para tener al ánodo del lado del detector y así poder detectar la separación de los aniones.

Bajo estas condiciones no es posible detectar analitos* cargados positivamente y todos los neutros salen junto con el flujo electroosmótico.

*Analitos Cargados Positivamente: Sustancia Química de interés que posee carga positiva.

1.6- Generalidades de Validación.

Es importante para este estudio saber, que un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra; que en este trabajo son los compuestos orgánicos e inorgánicos del selenio.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.^[2]

Los parámetros que determinan su objetivo son los siguientes:

- **Límite de Cuantificación:** Es la Concentración mínima del analito, que pueden ser determinadas con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.
- **Límite de Detección:** Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
- **Exactitud:** La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.
- **Precisión:** En un método analítico la precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

- Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).
- Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, diferentes días, en el mismo laboratorio y el mismo equipo).
- Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es la habilidad de asegurar que los resultados analíticos; los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia en estudio dentro de un intervalo determinado.⁽⁶⁾

1.7 Características del Selenio

El Selenio fue descubierto por Berzelius y Ganh en 1817. El Selenio está reconocido como un metaloide importante para la industria, el ambiente, la toxicología y la biología. El elemento existe en forma de compuesto orgánico e inorgánico en diferentes estados de oxidación, entre las formas inorgánicas está el selenio elemental (Se), el selenato (SeO_4^{2-}) y el Selenito (SeO_3^{2-}); cabe mencionar que las especies orgánicas son aminoácidos (Selenio metionina, Seleno cistina) y sus derivados.⁽¹⁾

Las sales minerales son indispensables en la dieta de los ovinos, puesto que ellas intervienen en varias de sus funciones vitales y en su constitución física. Algunos son tomados directamente de los alimentos que los contienen, mientras que otros deben ser obligatoriamente suplidos bajo la forma de polvos o bloques minerales.⁽⁷⁾

El selenio es un elemento esencial a nivel de trazas, además de que es un elemento el cuál dependiendo de su concentración y forma química, puede ser un elemento esencial o un agente tóxico poderoso para la gente, el ganado aves acuáticas, peces y ciertas bacterias; este comportamiento del selenio depende de la concentración, forma química y disponibilidad.^(1,4,7)

Desde algunos años, se ha indicado que la concentración de Selenio en la dieta interviene en el metabolismo de los rumiantes, esto ha sido observado en áreas deficientes de Selenio, por lo que la adición de Selenio en la dieta del animal es capaz de advertir pérdidas anuales en las distintas especies domésticas.⁽⁷⁾

Las deficiencias nutricionales de Selenio afectan de manera importante la producción ovina, sobre todo en la etapa de desarrollo de los corderos y durante la gestación de las ovejas. Se ha observado que en los corderos la edad que más se ve afectada por deficiencia de selenio oscila entre los 31 y 45 días.^(7,15)

En la dieta de rumiantes la deficiencia de selenio esta asociada con la degeneración muscular o debilidad. La más prominente de estas condiciones es la distrofia muscular o debilidad. La más prominente de estas condiciones es la distrofia muscular nutricional, una enfermedad metabólica que se presenta con mayor frecuencia en ganado ovino, pero que también se presenta en ganado bovino.

La distrofia muscular nutricional y otras enfermedades en respuesta al selenio se encuentran difundidas en áreas donde los alimentos consumidos contienen entre 20 y 30 ppb de selenio basándose en materia seca. Suplementos de Selenito, Selenato y de proteínas ricas en Selenio han sido utilizada para corregir dichas deficiencias.^(1,15)

Además de que ciertos problemas reproductivos en bovinos y ovinos están relacionados con la incompetencia muscular resultante de la deficiencia de selenio. Cabe mencionar que una de las enfermedades más importantes en vacas lecheras es la placenta retenida.⁽¹³⁾

Cabe mencionar que la administración de Selenio es altamente efectivo en la prevención de la enfermedad cuando se suplementa a ganado joven o vacas preñadas.

Es necesaria la suplementación de Selenio ya que en algunos de los alimentos y forrajes que crecen en ciertas áreas, no contienen suficiente selenio para cubrir los requerimientos del ganado. El Selenio orgánico es la forma principal para animales que consumen alimentos naturales.^[7]

1.7.1 Metabolismo del Selenio

Existen diversos factores que influyen en el metabolismo del Selenio como son la formas química del Selenio, Azufre, Arsénico, metales, microorganismos, vitamina E y la ingesta previa de Selenio.

En el caso de los rumiantes los responsables de la más baja absorción de Selenio son los microorganismos que se encuentran en el rumen. Gran parte del Selenio absorbido en la dieta es reducido a su forma insoluble por microbios del rumen; un mayor porcentaje de la forma inorgánica que de la forma orgánica es convertida a estas formas insolubles. Parece ser que los microbios del rumen son capaces de convertir Selenio inorgánico a compuestos orgánicos de Selenio, así como de incorporar compuestos de Selenio en proteínas bacterianas.^[7,19]

El Selenio es un elemento que se absorbe rápidamente en el tracto intestinal. Su principal sitio de absorción es entre el duodeno y el ileón, no se absorbe en el rumen o abomaso de las ovejas, ni en el estómago del cerdo. El Selenio se absorbe eficazmente ya sea de los nutrientes que contienen Selenio natural o como Selenito inorgánico.

En los rumiantes la absorción de selenio se efectúa como Seleno Metionina o Seleno Cistina. Debido a que las bacterias ruminales son capaces de metabolizar el Selenio inorgánico e incorporarlo a la proteína bacteriana. Cuando el Selenio ya fue absorbido es llevado por el plasma donde ocurre una transformación química, previa a su unión con proteínas plasmáticas y globulinas.

La pérdida de Selenio se efectúa por los pulmones, heces y orina. La porción que se excreta por cada vía depende de la ruta de administración, los niveles tisulares y la especie animal. Cabe mencionar que la vida media del Selenio es diferente en cada tejido y esta relacionada directamente con la dieta.⁽⁴⁷⁾

1.8 Características de la muestra.

En este trabajo se utilizaron dos muestras biológicas el Líquido ruminal y la Masa Bacteriana ruminal para cuantificar los Seleno aminoácidos presentes. Debido a que estas muestras son biológicas y provienen del rumen es lógico que contengan varios componentes, separándose en tres, la parte de Protozoarios, la Masa Bacteriana y el Líquido ruminal.

Por lo anterior es necesario saber que es el rumen; ya que de aquí provienen las muestras empleadas en este trabajo, como ya se menciono. El estómago de un rumiante consta de cuatro compartimientos o divisiones; a las cuales se les conoce como: rumen, retículo rumen, omaso y abomaso. El rumen se considera el primer estómago, el retículo el segundo y así sucesivamente.

Después de definir al rumen, es importante hablar de su naturaleza; por lo que, es necesario saber que el retículo-rumen alberga una gran cantidad de bacterias y protozoos. Esos organismos y sus metabolismos, junto con la saliva y las sustancias ingeridas, constituyen los factores más importantes para el contenido ruminal.

Uno de los factores más variables en el contenido del rumen es la materia seca; dicha materia seca se encuentra aproximadamente de un 10 al 15% del contenido ruminal, y esta depende mucho de la naturaleza del alimento y del tiempo transcurrido entre la comida y la bebida del animal a la toma de las muestras.^(7,13)

La densidad que presenta el rumen es de 1.022 y 1.055 aproximadamente, aunque esto varía dependiendo del animal y del alimento que ingiera. Por lo que los datos de materia seca y densidad solo son aproximados y están sujetos a error.

La temperatura normal del rumen se considera que va de 39 a 40° C, aunque ésta varía dependiendo del animal, ya que si se encuentra en ayuno la temperatura aumenta.

La fermentación activa de los alimentos tales como el heno de alfalfa, pueden producir temperaturas ruminales altas como de 41°C. Además del alimento la temperatura ruminal puede variar con la ingesta de agua, la cual se encuentra a temperaturas más bajas que las del rumen; logrando así que la temperatura del rumen descienda de 5 a 10°C.⁽¹³⁾

El pH del rumen también es un factor importante, el cual también varía según la naturaleza de la dieta y del tiempo en que se mida tras la ingestión. Las fluctuaciones de este en el rumen reflejan los cambios en las cantidades de ácidos orgánicos que se acumulan en la ingesta y de la cantidad de saliva que se produce. El valor obtenido de pH en el rumen después de la ingesta de alimento oscila entre 4.43 y 6.5, pero si es considerado antes de la ingesta de alimento va de 6.25 a 7.3.⁽¹³⁾

Con lo anterior podemos saber que la composición de rumen es compleja, y que los solutos que podemos encontrar en el líquido ruminal son tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. Estos solutos se pueden originar de los sólidos o líquidos ingeridos, de la saliva, de las secreciones o pueden ser metabolitos de los microorganismos.⁽¹³⁾

Dentro de los solutos inorgánicos que se pueden encontrar en el líquido ruminal tenemos al Sodio (Na), Potasio (K), entre otros; mientras, que de los compuestos orgánicos se encuentran compuestos nitrogenados, ácidos grasos volátiles, ácidos orgánicos y otros gases ruminales, etc. En cuanto al más importante de los compuestos inorgánicos que se pueden encontrar en el rumen esta el Selenio (Se), el cuál se cuantificara en este trabajo.

La microbiología del rumen es un tema apasionante y complejo, debido a las grandes cantidades de organismos presentes, su diversa naturaleza y la población cambiante que produce la dieta o del mismo animal.

El rumen presenta un ambiente muy favorable para el crecimiento microbiano, ya que el pH que oscila entre 5.5 y 7 y la temperatura (39-40°C) son casi óptimos para muchos de los sistemas enzimáticos; el alimento llega a él de una forma más o menos continua y las contracciones de las paredes del estómago favorecen la puesta en contacto de los microorganismos en todo momento con alimentos recién ingeridos o rumiados.

Las condiciones de humedad también son favorables para muchos microorganismos y los productos finales de fermentación. El resultado de todo este ambiente favorable crece una abundante población de organismos en el retículo-rumen, por lo que puede constituir el 10% del contenido ruminal.^[4,7,13]

Las dos principales clases de microorganismos del rumen son las bacterias y los protozoos, aunque también se encuentran ocasionalmente cantidades apreciables de levadura. Por lo regular se encuentran protozoos flagelados, sobre todo en animales jóvenes.

Las condiciones del rumen son anaerobias o facultativas. Por lo que se puede considerar a un microorganismo típico del rumen, debe satisfacer las siguientes características:

- 1) El organismo debe de ser capaz de vivir anaeróticamente
- 2) Debe ser capaz de producir un tipo de producto final que se encuentre en el rumen.
- 3) Debe haber por lo menos un millón/g de gérmenes de este tipo en el líquido ruminal.

De las bacterias que más se pueden encontrar en la masa bacteriana ruminal son: bacterias celulolíticas*, bacterias que digieren la hemicelulosa*, bacterias amilolíticas*, bacterias que utilizan azúcares, bacterias que utilizan ácidos, bacterias proteolíticas*, organismos productores de amoníaco, bacterias que producen metano, bacterias lipolíticas, organismos que sintetizan vitaminas.^[13]

*Celulolíticas: Bacterias que poseen la capacidad bioquímica de digerir la celulosa. * Hemicelulosas: Bacterias que tienen la capacidad bioquímica de digerir la hemicelulosa. * Amilolíticas: Bacterias que digieren el almidón. * Proteolíticas: Bacterias que emplean aminoácidos como fuente primaria de energía.

1.9.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si se establece un pretratamiento adecuado para las muestras de Líquido y Masa Bacteriana ruminal; entonces, se podrá realizar la cuantificación de los Seleno componentes presentes en dichas muestras por medio de un método desarrollado por Electroforesis Capilar.

1.10.- JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia que tiene el consumo moderado de Selenio (Se), tanto para los hombres como para los animales, es de suma relevancia tener en el mercado productos que puedan suministrar este tipo de elemento esencial en los animales. Actualmente en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se diseñaron bolos intraruminales para administrar selenio a ovinos, caprinos y bovinos; pero no se conoce el efecto que estos tienen sobre la flora ruminal y su relación con su biodisponibilidad, por lo tanto es importante desarrollar métodos analíticos que permitan monitorear cambios en la producción de aminoácidos provocados por la suplementación de Selenio.

2.- OBJETIVOS

- Desarrollar una metodología analítica por Electroforesis Capilar, que permita separar y cuantificar compuestos orgánicos e inorgánicos de Selenio (Seleno Cistina, Seleno-Metionina, Selenito y Selenato) en muestras de líquido y masa bacteriana ruminal.

2.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un pretratamiento adecuado para muestras de líquido ruminal que permita la determinación de los compuestos de selenio existentes en dicha muestra.
- Determinar un pretratamiento adecuado para tratar las muestras de masa bacteriana ruminal, para lograr la separación y cuantificación de los compuestos de selenio que puedan estar presentes en dicha muestra.
- Aplicar los parámetros relacionados con una validación, para determinar si el método para cuantificar seleno aminoácidos, cumple con los parámetros establecidos en la guía de validación y es por lo tanto un método confiable.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

4 vasos de precipitados de 10ml

3 vasos de precipitados de 50ml

1 Barra Magnética

1 Espátula

3 Matraz aforado de 50 ml

1 Micro pipeta 100- 1000 μ l

1 Micro pipeta 20- 200 μ l

1 Micro pipeta 5-50 μ l

Puntas para micro pipeta

Piseta

EQUIPO

1 Balanza analítica Sartorius

1 Agitador magnético Cimarec

1 Equipo de Electroforesis Capilar (Beckman-Coulter PACE-MDQ)

REACTIVOS

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)

CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Sigma-Aldrich)

HCl Concentrado

NaOH Gránulos

Agua Desionizada

Estándares:

Selenito de Sodio (Sigma-Aldrich) Pureza 98% P.M= 172.9

Selenato de Sodio Anhidro (Sigma-Aldrich) P.M= 188.9

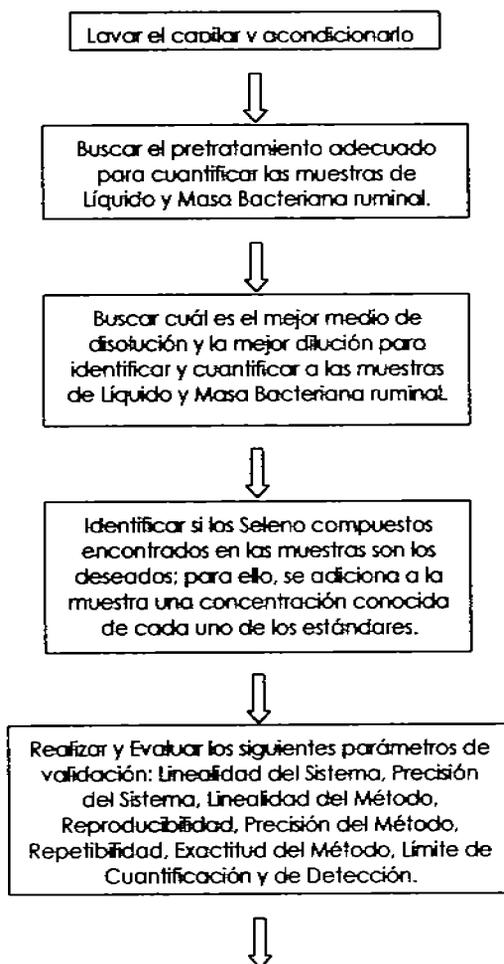
Seleno DL-metionina Anhidro (Sigma-Aldrich) P.M= 196.1

Seleno DL-cistina Anhidro (Sigma-Aldrich) P.M= 334.1

Para la preparación de los estándares se disolvieron en agua desionizada; cabe mencionar que para la disolución de Seleno cistina se le agregaron gotitas de HCl 0.1M para su disolución total. Todos los estándares deben guardarse en frascos ámbar y deben estar perfectamente cerrados.

3.1.- MÉTODOS

Para comenzar a trabajar, todos los días se debe de lavar el capilar introduciendo agua desionizada 3 min. con 20 psi. de presión, seguido de NaOH 0.1M por 3 min. a 20psi, posteriormente se vuelve a enjuagar con agua desionizada 3 min. a 20 psi y para finalizar se equilibra el capilar con buffer de lavado (el mismo con el que se realiza la separación) durante 8 min. a 20 psi.





Cuantificar los seleno compuestos en las muestras de líquido y masa bacteriana ruminal; de muestras obtenidas de animales, sin la administración de un bote de Selenio como complemento alimenticio; y de animales con el tratamiento de este bote de Selenio.

Cabe mencionar que en este trabajo se utilizaron muestras de líquido ruminal y masa bacteriana ruminal las cuales, fueron obtenidas gracias al apoyo de la Universidad de Chapingo. En dicha Universidad, se encuentran borregos que fueron sometidos a una ligera cirugía para implantarles una cánula a la altura del estómago, esta cánula permite obtener las muestras utilizadas en esta tesis.

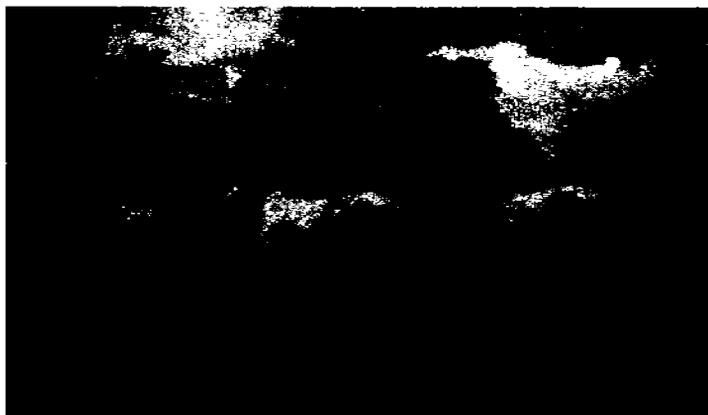


Figura 7. Imagen de animales canulados.

3.2.- Obtención de la muestra de líquido ruminal.

Se obtiene el líquido ruminal de la siguiente forma:

- 1.- Como ya se menciono el ganado vacuno del cuál se obtuvieron las muestras, poseen unas cánulas.
- 2.- Se sujeta fuertemente al animal (borrego), al que se le va tomar la muestra.
- 3.- Se quita la tapa de la cánula.
- 4.- Se coloca un guante de plástico en las manos.
- 5.- Se introduce la mano y con un vaso se va sacando el contenido del rúmen.
- 6.- La muestra obtenida se vacía en un recipiente.
- 7.- Una vez obtenida la muestra, se lleva a una centrifuga y se centrifuga a 15 000 rpm. por 30 min.; este paso tiene como fin separar el contenido de protozoarios existente en la muestra.
- 8.- Posteriormente las muestras son etiquetadas y guardadas en un frasco en el congelador, ya que deben estar a bajas temperaturas, para evitar su degradación.

3.3.- Obtención de la muestra de masa bacteriana ruminal.

De la muestra obtenida de líquido ruminal, se obtiene la masa bacteriana ruminal de la siguiente forma:

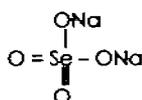
- 1.- En tubos para centrifuga se vacía el líquido ruminal, el cuál se centrifuga a 10000 rpm durante 15 min.
- 2.- El sedimento formado en el paso 1, se vacía en otro tubo, el cuál se vuelve a centrifugar a 10000 rpm. por 15 min.
- 3.- Se recolectan todos los sedimentos obtenidos en cada centrifugado y estos conforman la masa bacteriana ruminal utilizada en este proyecto.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

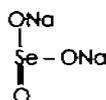
Para la realización de este trabajo se partió de la referencia 1. Debido a que en esta tesis se desarrolló un método por Electroforesis Capilar para cuantificar compuestos de Selenio en una levadura enriquecida; por lo tanto, en este trabajo se comenzó por probar si las condiciones del método desarrollado en dicha tesis, eran útiles para determinar los Seleno compuestos en las muestras biológicas (Líquido y Masa Bacteriana ruminal).

Por lo consiguiente, para desarrollar cualquier método o realizar cualquier análisis, es necesario conocer las moléculas de interés para determinar los grupos funcionales que pudieran ayudar a la separación de los analitos y el pK_a que presentan los mismos.

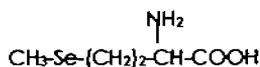
A continuación se presentan las estructuras químicas de los analitos de interés.



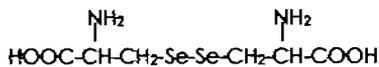
Selenato de Sodio



Selenito de Sodio



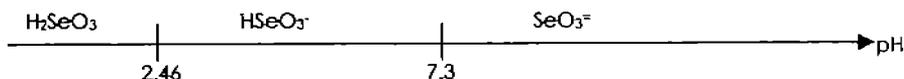
Seleno Metionina

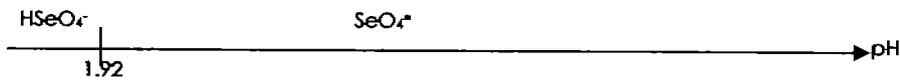
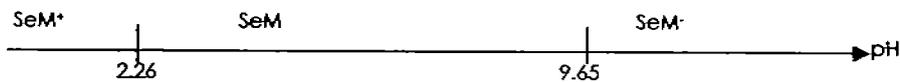
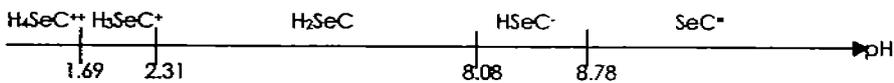
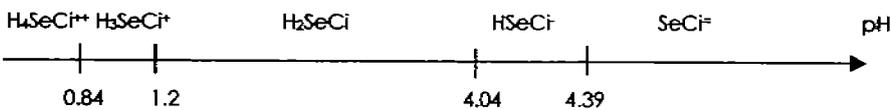


Seleno Cistina

Los pK_a 's reportados por Bolard 1983, Da Silva 1997, citados por Zheng, et. al. 2000, muestran el comportamiento de los cuatro compuestos de interés en función del pH.

En las siguientes escalas de pH se muestra las especies predominantes en función del pH para los compuestos de selenio inorgánico y orgánico bajo estudio.

Selenio Inorgánico**Se (IV) Selenito**

Se (VI) Selenato**Selenio Orgánico****Se-met (Seleno Metionina)****Se-cis (Seleno cistina)****Se-cis1 (Seleno cisteína)**

Las anteriores escalas de pH, muestran que de acuerdo a los pKa's reportados, la separación puede realizarse a pH mayores de 9.7, ya que cada compuesto tiene una carga y un peso molecular diferente lo cual ayudaría a la separación.

Cabe señalar que el Selenato, el Selenito y la Seleno Cistina a pH mayores de 9.7 se comportan como aniones divalentes, y la diferencia de peso molecular permite que migren a diferente velocidad por lo que permite lograr la separación. Mientras que a estos valores de pH la Seleno Metionina se comporta como un anión monovalente por lo cual tendrá una velocidad de migración más lenta a comparación con los otros analitos, por lo que será el último compuesto en migrar.

Una vez establecido el posible orden de migración de los analitos de interés, de acuerdo a su pK_a , es necesario establecer las condiciones de análisis, para poder llevar a cabo la cuantificación, tomando como base, las condiciones establecidas en la referencia 1 y las cuales son mencionadas a continuación:

4.1 Condiciones del Método

Capilar de 50 μ m de diámetro interno, 59 cm de longitud total, 48.5 cm de longitud efectiva.

- Buffer $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5mM, Na_2HPO_4 5mM, CTAB 2.0 mM pH= 10.5.
- Introducción hidrodinámica 0.5 psi 25 segundos.
- Voltaje de separación 25 kV con polaridad invertida o negativa.
- Lavado del capilar con buffer por 1 min. a 20 psi después de cada separación.
- Temperatura del capilar de 25°C.
- Detección a 210 nm.
- Solución de estándares mantenerse en refrigeración y preparar antes de introducirlas.
- *Filtrar el buffer de separación y de lavado con acrodiscos.*

Bajo estas condiciones de análisis se inyecta en el equipo una mezcla de los 4 estándares que se pudieran encontrar en la muestra, para la identificación de cada compuesto de selenio, ya sea orgánico e inorgánico.

Por lo que en la Figura 8 se muestra la separación de los 4 estándares. El quinto pico que se observa es un producto de degradación de la Seleno Cistina.

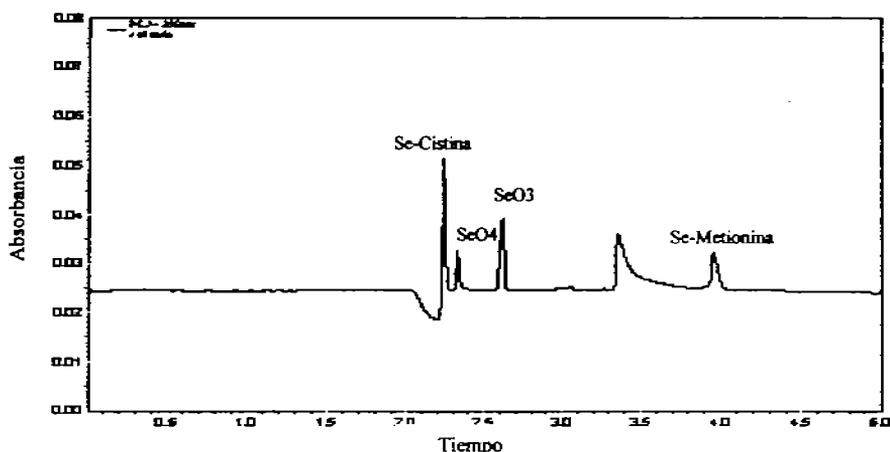


Figura 8. Electroferograma de Mezcla de Estándares Se-cis 200ppm, Se-met 200ppm, SeO_3 200ppm, SeO_4 0.1 ppm.

Una vez observado el electroferograma obtenido, de la mezcla de los 4 estándares y para su identificación, en la Tabla 1 se muestran los tiempos de migración de cada uno de los derivados de selenio.

Estos tiempos obtenidos permiten ver cada compuesto de interés de forma clara y definida, sin que se junte un pico con otro, dando como resultado un electroferograma óptimo para cada Seleno compuesto.

Tabla 1. Tiempo de Migración de los derivados de Selenio orgánico e inorgánico.

Derivado de Selenio	Tiempo de Migración
Se-cistina	2.3 min.
Se-metionina	4.0 min.
SeO ₃	2.6 min.
SeO ₄	2.4 min.

Posteriormente se determino si bajo estas condiciones de análisis era posible determinar los Seleno-aminoácidos en la muestra de Líquido ruminal; cabe mencionar, que se utiliza dicha muestra; debido a que, esta es líquida y más fácil de obtener, además es más fácil manejarla, aunado a que las muestras que se inyectan en el equipo deben ser homogéneas y sin precipitados, para que no se tape el capilar.

4.2 LÍQUIDO RUMINAL

Con los experimentos siguientes se comprobó que, empleando estas condiciones del método, es posible determinar los derivados de selenio tanto orgánico como inorgánico, en las muestras de líquido ruminal; por lo tanto, se procedió a establecer un pretratamiento adecuado para la inyección de las muestras en el equipo de electroforesis capilar.

Metodología del pre-tratamiento para la inyección del Líquido ruminal.

1.-Como un inicio la muestra que fue centrifugada en el momento de su obtención se vuelve a centrifugar a 10 000 rpm. Por 15 min.; el sobrenadante obtenido se pasa a otro tubo y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones (este paso se repite una vez más). Con este paso obtenemos el líquido ruminal, libre de protozoarios y bacterias.

2.-Del sobrenadante obtenido en la última centrifugación del paso anterior se toma 100 μ l.

3.-Después se procedió a determinar cuál era la mejor dilución y el mejor medio de disolución para la cuantificación y detección de los Seleno aminoácidos bajo las condiciones del método propuesto. Para lograrlo se lleva a diferentes disoluciones con agua desionizada y CTAB respectivamente.

El primer medio de disolución que se probó fue el CTAB con concentración 1.0 mM y se realizaron diluciones 1 en 3, 1 en 5, 1 en 4 y 1 en 10, para probar cual presentaba los mejores resultados.

A continuación se muestra la Figura 9, en la que se presentan los resultados obtenidos de las diluciones con CTAB.

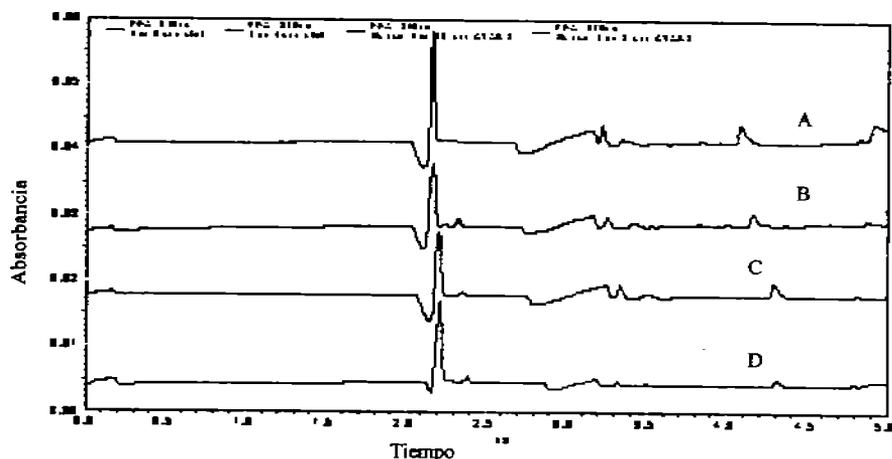


Figura 9. Electroferogramas de la muestra de líquido ruminal con diferentes diluciones con CTAB como medio de disolución. (dilución A) 1 en 5, B) 1 en 4, C) 1 en 10, D) 1 en 3).

Debido a que el CTAB no fue el mejor medio de disolución; no se eligió este para la cuantificación, ya que como se observa en el gráfico anterior no permite apreciar bien los Seleno aminoácidos en el líquido ruminal.

Por lo tanto se probó con agua como medio de disolución y las siguientes condiciones: sin dilución, dilución 1 en 2, dilución 1 en 3, dilución 1 en 4, dilución 1 en 10.

Como se puede ver en la Figura 10, se determinó que la mejor dilución es la de 1 en 4 y que el mejor medio de disolución es el agua, por lo que, para la cuantificación en las muestras de líquido ruminal; se realizaron bajo estas condiciones partiendo de los 100µl, obtenidos en el paso 2 del ya antes mencionado pretratamiento para la inyección de dicha muestra.

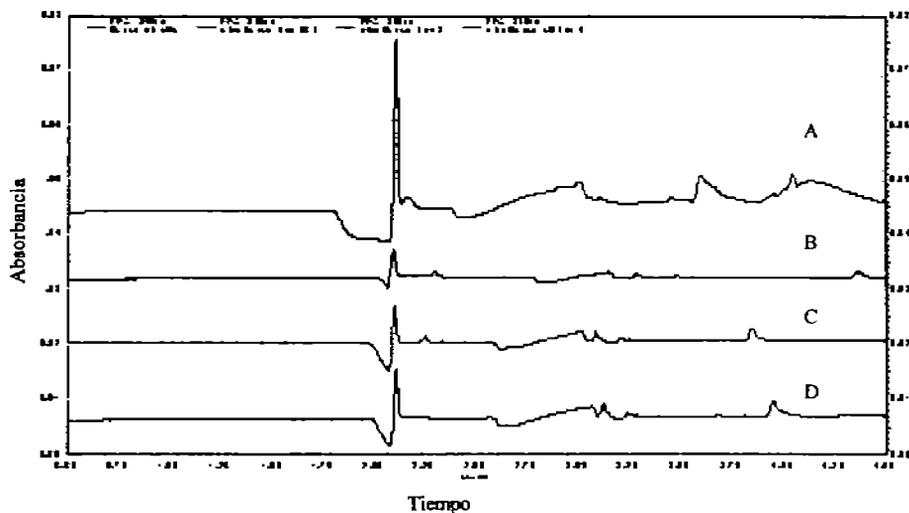


Figura 10. Electroferogramas de la muestra de liquido ruminal con medio de disolución agua y con las siguientes diluciones (A sin dilución, B dilución 1 en 3, C dilución 1 en 4, D dilución 1 en 10).

La Figura 11; muestra el electroferograma obtenido de la mejor dilución y el mejor medio de disolución; encontrado para llevar a cabo la cuantificación del Líquido ruminal.

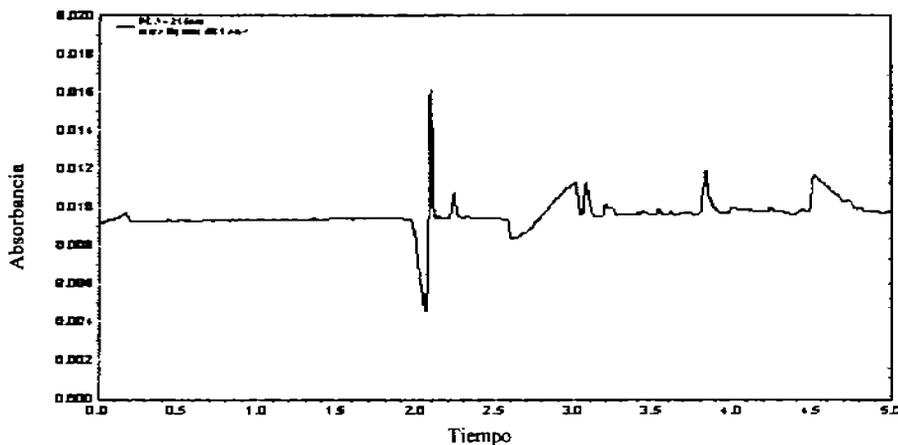


Figura 11. Electroferograma de la mejor dilución (1 en 4) de la muestra de Líquido ruminal.

Una vez encontrada la mejor dilución y medio de disolución para Líquido ruminal, se prosiguió a la adición de los estándares de cada Seleno aminoácidos y de los compuestos de Selenio inorgánico en las muestras, con el objetivo de identificar cada Seleno compuesto; esto se logró, adicionándole las siguientes concentraciones 20 ppm de estándar de Seleno Cistina, 20ppm de estándar Seleno Metionina, 20ppm de estándar de SeO_3 y la adición de 0.1 ppm para el SeO_4 .

En el Figura 12, se aprecia que la muestra de Líquido ruminal solo se determinó la presencia de SeO_4 y los dos Seleno aminoácidos (Seleno Metionina y Seleno Cistina).

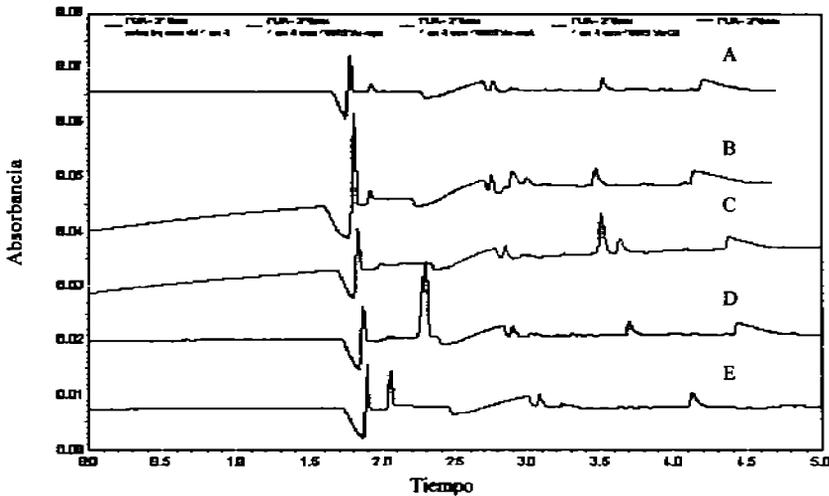


Figura 12. Electroferogramas con la adición de estándar en la muestra de líquido ruminal. (Dilución 1 en 4 A: sola, B: + 20ppm de se-cistina, C: + 20 ppm de se-met, D: + 20 ppm de SeO_3 , E: + 0.1 ppm de SeO_4).

Después de identificar cuales son los seleno compuestos presentes en el líquido ruminal; en este trabajo también se inyectaron muestras de Líquido ruminal obtenidas de de animales que fueron sometidos a una dieta rica en Selenio, por medio de la administración de un bolo de selenio; y de dichas muestras se obtuvo el electroferograma de la Figura 13.

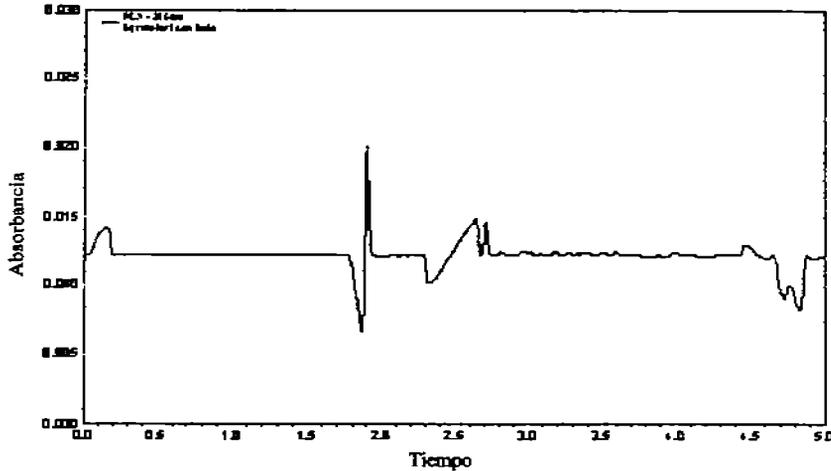


Figura 13. Electroferograma de Líquido ruminal con dilución (1 en 4) de una muestra obtenida después del tratamiento con bolos de Selenio, en los rumiantes.

4.3 MASA BACTERIANA RUMINAL

Posteriormente se determinó el pretratamiento que debe de seguirse para la inyección de la muestras de Masa Bacteriana ruminal

Metodología del Pre-tratamiento para la inyección de la Masa Bacteriana Ruminal.

Dicho pretratamiento parte de la recolección de los sedimentos obtenidos en el paso 1 (del pretratamiento para la inyección del líquido ruminal); estos sedimentos nos permiten obtener a la masa bacteriana; y su pretratamiento consta de sonicar la muestra por 15 min. Tomar 100 μ l del líquido formado y llevarlo a dilución de 1 en 20, con agua desionizada para después filtrarlo con un acrodiscos.

El filtrado anterior de la muestra se colecta en un vial para inyectarlo inmediatamente en el equipo.

Por lo que en la Figura 14, se muestra el electroferograma que se obtiene de la inyección de la masa bacteriana ruminal, bajo las condiciones antes mencionadas.

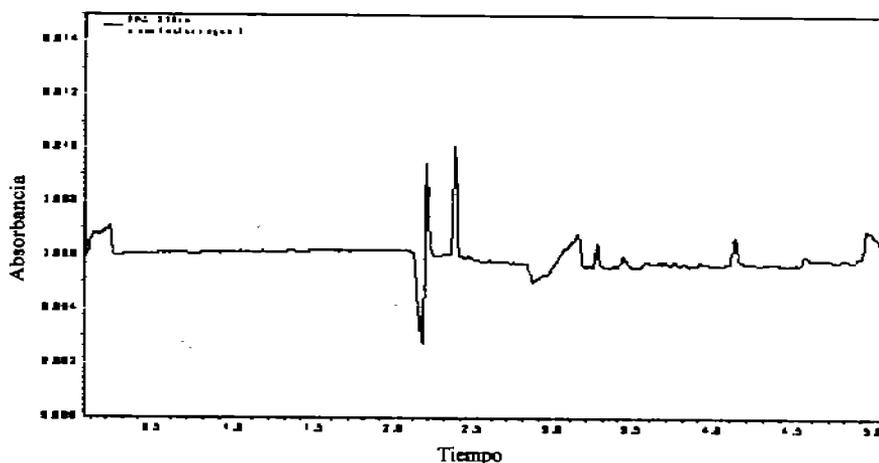


Figura 14. Electroferograma de la dilución I en 20 de la muestra de Masa Bacteriana ruminal.

Una vez encontrada la dilución y el medio de disolución óptimos para la Masa Bacteriana ruminal, se procedió a identificar los picos que aparecían en dicha muestra; añadiendo una concentración conocida de los estándares de selenio orgánico e inorgánico que se supone que debieran estar presentes en la muestra.

El electroferograma de la Figura 15, hace más representativa dicha identificación; en el cual se observa que la Masa Bacteriana ruminal tiene presente al SeO_4 (Selenio inorgánico); Seleno Cistina y Seleno Metionina (Selenio orgánico).

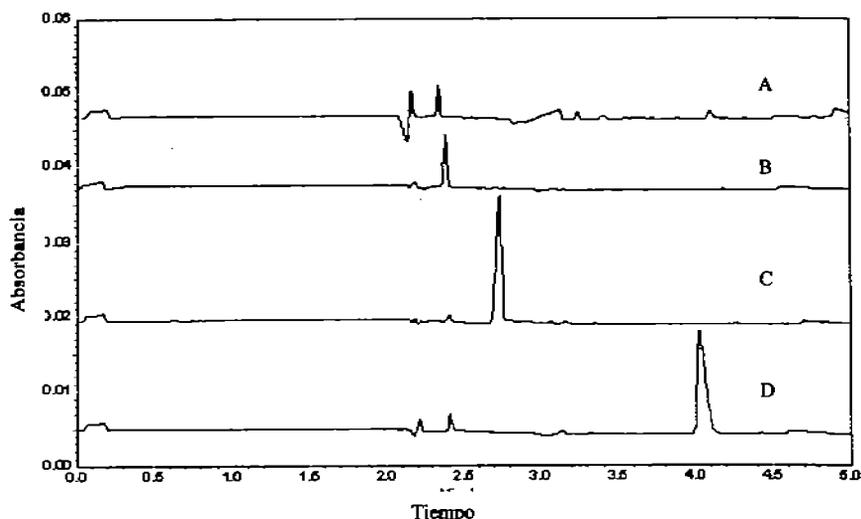


Figura 15. Electroferogramas de la muestra de masa bacteriana y la adición de Std. (Dilucion A: 1 en 20, B: 1 en 20+ 0.1 ppm SeO_4 , C: 1 en 20 + 0.1 ppm SeO_3 , D: 1 en 20 + 50ppm de Se-met).

Después de la identificación de los Seleno compuestos en las muestras anteriores, se inyectaron muestras de Masa Bacteriana ruminal, pero obtenidas; de animales sometidos a una dieta rica en Selenio, con la administración de bolos intraruminales; con el fin de determinar la cantidad de Seleno compuestos existentes en las muestras después de dicho tratamiento.

Por lo tanto se muestra el electroferograma de la Figura 16, de las muestras obtenidas, después de la administración de bolos de selenio en los rumiantes.

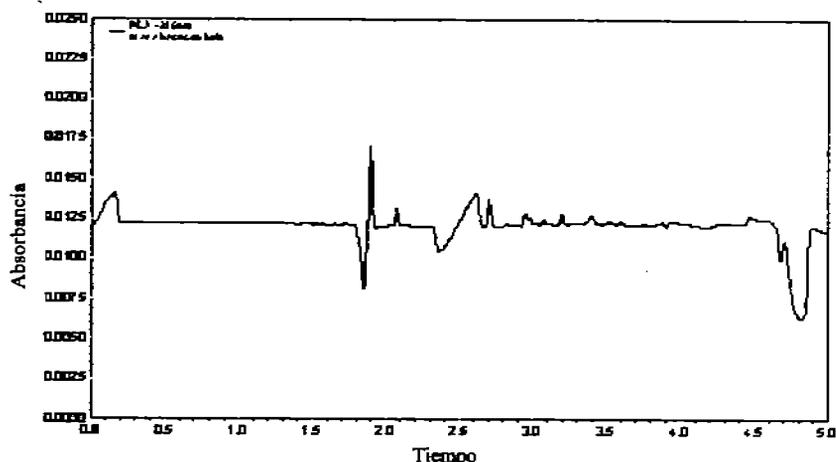


Figura 16. Electroferograma de la Masa Bacteriana Ruminal Dilución (1 en 20), de una muestra obtenida después del tratamiento con bolos de selenio, en rumiantes.

4.4 Validación del Método

Después de la identificación de los Seleno compuestos presentes en las muestras de interés en este trabajo; se evaluaron los parámetros de validación del método utilizado, debido a que no se le realizó ningún cambio al método planteado en la tesis "Caracterización y Cuantificación de compuestos de Selenio en una levadura enriquecida por electroforesis Capilar".

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en la validación se analizaron con un programa estadístico llamado Statgraphics 4.0 y con Excel, para facilitar su explicación.

Los parámetros de validación únicamente fueron determinados con muestras de Líquido ruminal; debido a que es más fácil obtenerlo en cantidad suficiente, lo cual facilita trabajar las muestras por triplicado o sextuplicado según sea el caso del parámetro a analizar.

Los parámetros analizados en esta validación son: Linealidad del Sistema, Linealidad del Método, Precisión, Reproducibilidad, Exactitud, Repetibilidad, Límite de Cuantificación y Límite de Detección.

En la Tabla 2, se muestran los criterios de aceptación, basados en la guía de validación; para evaluar los parámetros que se realizaron en este trabajo, para la muestra de Líquido ruminal.

Tabla 2. Criterios de Aceptación considerados para la validación del método utilizado en este trabajo con la muestra de Líquido ruminal.

PARAMETROS DE VALIDACION	CRITERIOS DE ACEPTACION
LINEALIDAD DEL SISTEMA	C.V. \leq 2% muestras biológicas Coeficiente de correlación ($r \geq 0.98$) Coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.99$)
LINEALIDAD DEL METODO	C.V. \leq 5% muestras biológicas $r \geq 0.98$, $b=0$, $m \approx 1$ % Recobro: 95 – 105% muestras biológicas. C.V. % Recobro \leq 5% muestras biológicas $T_{cal} < T_{tab}$ ($\alpha 0.05$, 14) (Prob.95%, g.l n-1) L.I.C y L.S.C= Prom. +/- ($T_{95\%} * S/n$)
PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD	C.V. \leq 5% muestras biológicas $F_{cal} \leq F_{critica}$ ($\alpha 0.05$, 1,2) (Prob 95%, g.l (análisis , error) $F_{cal} \leq F_{critica}$ ($\alpha 0.05$, 2,8) (Prob 95%, g.l (día, error)
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	C.V. \leq 5% muestras biológicas $T_{cal} \leq T_{tab}$. ($\alpha 0.001$, 5) (Prob 99%, g.l n-1) L.I.C y L.S.C= Prom. +/- ($T_{99\%} * S/n$)

Para comenzar este análisis estadístico, se explican los parámetros de validación obtenidos para la Seleno Cistina.

4.5 SELENO CISTINA

4.5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Como un inicio para la validación es importante realizar una curva de calibración la cuál nos permita determinar si nuestro sistema es lineal; es decir, si una curva de calibración realizada con estándares presenta o no un comportamiento lineal.

Partiendo de una solución stock de 1000 ppm, se prepararon los puntos de la curva de calibración como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de la Curva de Calibración para Seleno Cistina.

Alicuota (μ l)	Aforo (ml)	Concentración (ppm)
100	5	2
200	5	40
300	5	60
400	5	80
500	5	100

Una vez preparada la curva de calibración se inyectó cada punto de la curva por triplicado. En la Tabla 4, se observa el rango de concentraciones al cuál se llevo a cabo el análisis, así como el Área que se obtuvo en cada Concentración.

Tabla 4. Resultados obtenidos para la linealidad del sistema.

Concentración	Área	Area/Conc
20	6924	346.2
20	6939	346.95
20	6960	348
40	13203	330.075
40	13419	335.475
40	13556	338.9
60	20282	338.033
60	19832	330.533
60	19988	333.133
80	26231	327.888
80	26585	332.313
80	26361	329.513
100	33880	338.8
100	33522	335.22
100	33671	336.71

Para iniciar el análisis se comenzó por realizar una regresión simple del área entre la concentración.

Los resultados para la Linealidad del Sistema demuestran el modelo lineal que se obtiene de este análisis y el cuál; describe la relación que existe entre el área y la concentración real. La ecuación que explica dicha relación lineal es la siguiente:

$$\text{Área} = 140.3 + 332.498 * \text{Conc. real}$$

El Gráfico 1, muestra la relación lineal que presentaron los resultados de Área contra Concentración.

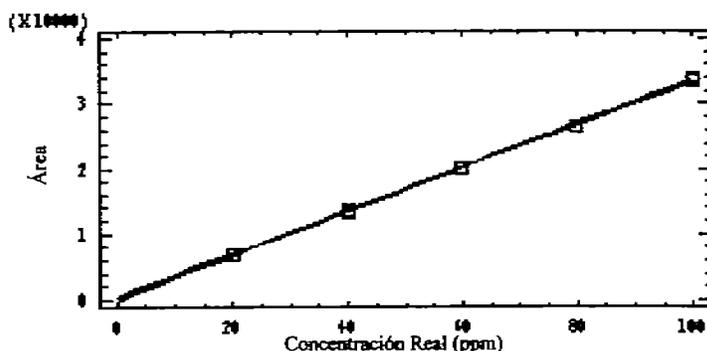


Gráfico 1. Relación lineal del Área contra la Concentración

Los parámetros obtenidos de la regresión, para esta linealidad aparecen en la Tabla 5; los cuales, muestran que la r^2 (coeficiente de determinación), especifica la linealidad del sistema con un 99.924% de la variabilidad en el área con respecto a los cambios de concentración de Seleno Cistina; mientras que el coeficiente de correlación, igual 0.999 indican una relación relativamente fuerte entre las variables. La estimación del error estándar muestra que la desviación estándar, de los residuales que es de 279.586.

Tabla 5. Parámetros de regresión simple

Coefficiente de Correlación	0.999
r^2	99.924
Estimación del Error Estándar	279.586

En el Gráfico 2 se observa, que los residuales no presentan ninguna relación lineal significativa; dado que cada resultado es independiente, con respecto a la concentración.

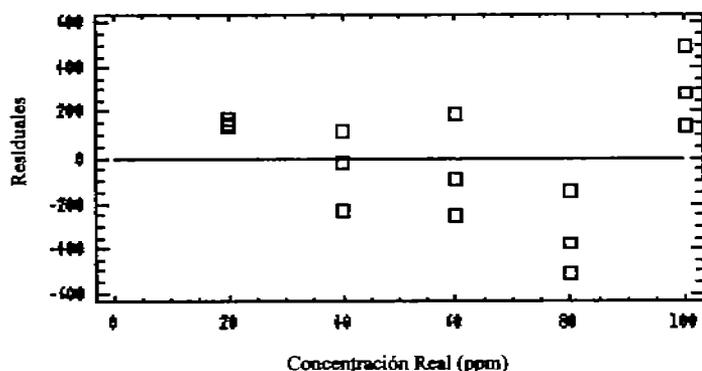


Gráfico 2. Muestra la tendencia de los residuales

También se determinó el comportamiento de los valores observados con los estimados; con el objetivo de, determinar su linealidad; derivándose el Gráfico 3; en el que se observa que los valores estimados y los observados son homogéneos; además de que presentan el mismo comportamiento.

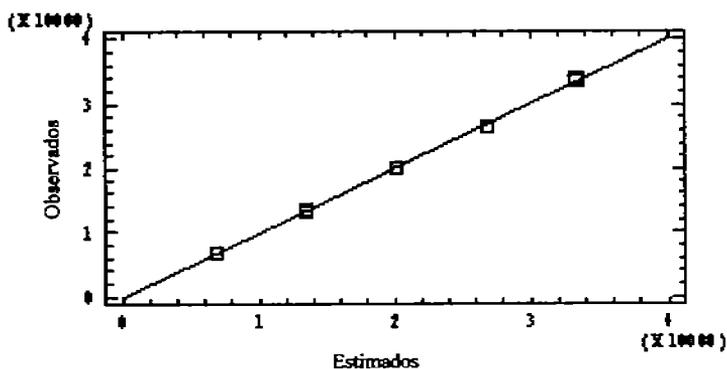


Gráfico 3. Comportamiento de los valores observados con los estimados para determinar la linealidad de Seleno Cistina

Se realizó una tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) con el fin de demostrar la relación que existe entre las variables estudiadas; para ello se plantean las siguientes hipótesis:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

H_A: Existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

El criterio de aceptación para estas hipótesis son:

Sí $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítica}}$ No se rechaza H₀.

Sí $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítica}}$ Se rechaza H₀.

En la Tabla 6, de ANOVA se observa que el F_{cal} es mayor a la $F_{\text{crítica}}$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula H₀, aceptándose H_A; por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

Tabla 6. ANOVA para linealidad simple con un nivel de confianza del 95%

Fuente	Suma de Cuadrados	g.L	Medida de Cuadrados	F_{cal}	$F_{\text{crítica}}$
Regresión	1.32666e9	1	1.32666e9	16971.89	6.8435e-20
Residuales	1.01619e6	13	78168.2		
Total	1.32768e9	14			

Posteriormente se evaluó la prueba del intercepto dada por la recta; de la cuál se deriva las siguientes hipótesis:

H₀: Sí $b=0$ la ordenada al origen es 0

H_A: Sí $b \neq 0$ la ordenada al origen es diferente de 0

Los criterios de aceptación para dichas hipótesis son:

$t_{\text{cal}} < t_{\text{crítica}}$ No se rechaza H₀

$t_{\text{cal}} > t_{\text{crítica}}$ Se rechaza H₀

Análisis de regresión para el modelo lineal para el intercepto $Y = a + b \cdot X$

En la que la variable dependiente es el Área

La variable Independiente es la Concentración real

Como se aprecia en la Tabla 7, la t_{cal} es menor a la t_{tabla} , por lo que al considerar los criterios de aceptación de las hipótesis planteadas para el intercepto, la hipótesis nula no se rechaza; o bien, la ordenada al origen sí incluye al cero.

En cuanto a los límites presentados en la Tabla 7, de regresión del modelo lineal la mayoría de los datos se encuentran dentro de los Límites tanto Inferior como Superior.

Tabla 7. Regresión del modelo lineal para el intercepto.

Parámetros	Estimado	Error Estándar	t_{cal}	t_{tabla}	P-valor	LLC	LS.C
Intercepto	140.3	169.298	0.829	2.145	0.422	331.984	336.695
Pendiente	332.498	2.552	130.276				

Una vez que se determinó que el modelo es lineal y que cumple con los parámetros de linealidad, se realizó un análisis de residuales.

En la Tabla 8, se muestra que la R-cuadrada, indica que el modelo es lineal con un 99.961% de la variabilidad en la concentración con respecto a la propiedad medida; mientras que el error estándar del estimado proporciona información acerca de la desviación estándar de los residuales con un valor de 0.606; en tanto que el error absoluto de la Media es de 0.462 nos da el valor medio de los residuales. La prueba estadística de Durbin-Watson (DW) permite determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden de aparición de los datos. Debido a que el valor de DW es mayor de 1.4, con una probabilidad (P) mayor de 0.05, no hay una seria auto correlación que altere el orden de los residuales.

Tabla 8. Análisis de Residuales para Seleno Cistina.

R-cuadrada =	99.961 Porcentaje
Error Estándar del Estimado =	0.606
Error absoluto de Media =	0.462
Estadística de Durbin- Watson =	2.487

Se plantea la siguiente hipótesis para determinar que la concentración adicionada es lineal con respecto al área.

H₀: El sistema presenta una correlación significativa en la propiedad medida

H_A: El sistema no presenta una correlación significativa en la propiedad medida

Criterio de aceptación

$F_{\text{cal}} < F_{\text{tablica}}$ No se rechaza H₀

$F_{\text{cal}} > F_{\text{tablica}}$ Se rechaza H₀

Por lo tanto se presenta la Tabla 9, de Análisis de Varianza (ANOVA) para analizar los residuales; la cual proporciona información acerca de que no existe una correlación estadísticamente significativa entre los residuales; debido a que la F_{cal} es mayor a la F_{tablica} .

Tabla 9. Análisis de Varianza para los Residuales.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.L	Medio de cuadrados	$F_{\text{calculada}}$	F_{tablica}
Área Real	12289.7	1	12289.7	33423.76	2.1447
Residuales	4.78002	13	0.367694		
Total (correg)	12294.5	14			

Para corroborar que el sistema no presenta una correlación significativa, a continuación se muestra el Gráfico 4; del análisis de los residuales.

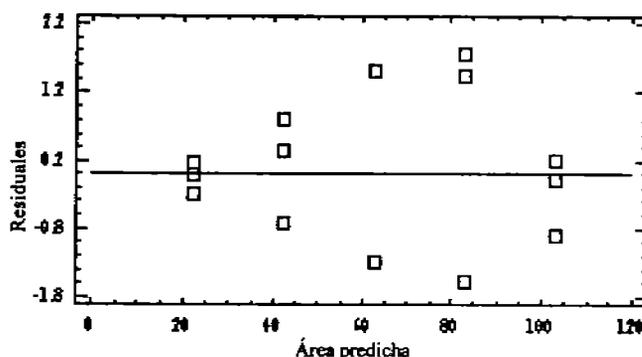


Gráfico 4. Análisis de residuales.

Se realiza un análisis de variable múltiple, entre todos los parámetros analizados en este trabajo; que permite calcular varios datos estadísticos de interés como correlaciones, covarianzas y un parcial de correlaciones, del cuál se deriva la Gráfica 5, que permite observar que no hay correlaciones entre las variables analizadas.

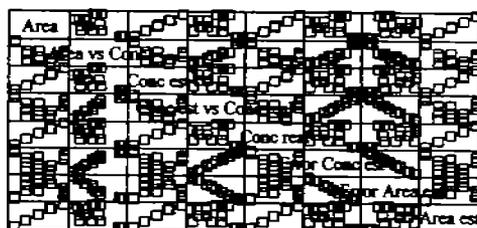


Gráfico 5. Correlación entre las variables en estudio para Seleno Cistina

Así como también se muestra que no hay correlaciones entre el error de la concentración estimada y el error del área estimada así como se muestra en el siguiente Gráfico 6:

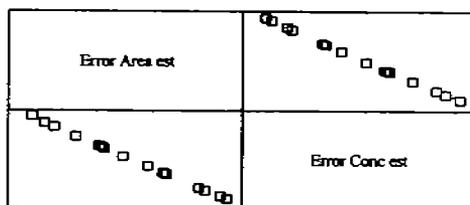


Gráfico 6. Correlación entre el Error de la Concentración Estimada y el Error del Área Estimada.

En la Tabla 10; se evalúan los parámetros obtenidos, para el análisis estadístico realizado para el error del área estimada y el error de la concentración estimada; En los cuales aparece la medida de tendencia central, medida de variabilidad y medida de forma. Pero uno de los datos que más información aporta a este análisis es la skewness

estandarizada y la kurtosis estandarizada; ya que puede ser usada para determinar si las variables presentan una distribución normal; siendo el rango de aceptación valores que se encuentren de -2 a $+2$; en este caso las variables de estudio presentan valores que se encuentran dentro del rango de aceptación, por lo que claramente se determina que el Área Estimada y el Error de la Concentración Estimada, presentan una distribución normal.

Tabla 10. Parámetros estadísticos para el Error del Área estimada y el Error de la Concentración estimada para Seleno Cistina.

Parámetro	Error Área estimada	Error Conc. estimada
Estimado	15	15
Promedio	-0.217	0.245
Varianza	2.108	2.183
Desviación Estándar	1.452	1.478
Mínimo	-2.439	-1.914
Máximo	1.941	2.553
Rango	4.379	4.467
Skewness Estándar	0.056	0.024
Kurtosis Estándar	-0.999	-0.984

4.5.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

En la Tabla 11, se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para evaluar si el área (propiedad medida), se encuentra dentro del intervalo de trabajo y si sus resultados son precisos; para ello se realizó un sextuplicado de la concentración de 60ppm, trabajada en la linealidad del sistema; de estos resultados se obtiene un coeficiente de variación menor de 2; haciendo que el sistema sea preciso.

Tabla 11. Datos estadísticos para evaluar la precisión del sistema de Seleno Cistina

Promedio del Área/ Conc.	336.516
Desv. Estándar	6.439
C.V (%)	1.913

4.5.2 LINEALIDAD DEL METODO

La linealidad del método se realizó, con 1ml de muestra (líquido ruminal) y a esta se le añadieron las concentraciones trabajadas en la linealidad del sistema es decir (20, 40, 60, 80, 100 ppm); respectivamente y las cuales e aforaron a 5ml.

Para determinar la linealidad del método de Seleno Cistina, se trabajo con concentraciones adicionadas y recuperadas; utilizadas para obtener los porcentajes de recobro que serán de ayuda, para llevar a cabo este análisis. En la Tabla 12, se observan los resultados obtenidos.

Tabla 12. Linealidad del método de Seleno Cistina que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.

Sistema	Conc Adic	Conc Recup	% Recobro
1	22.089	21.758	80.39
2	22.089	22.548	79.44
3	22.089	22.663	79.96
4	42.089	39.803	89.82
5	42.089	40.432	88.94
6	42.089	39.538	93.94
7	62.089	61.698	96.15
8	62.089	62.386	95.65
9	62.089	62.230	95.4
10	82.089	82.989	95.01
11	82.089	83.062	95.09
12	82.089	80.357	97.89
13	102.089	102.754	32.08
14	102.089	101.862	32.19
15	102.089	102.598	31.93

Para la linealidad del método es importante determinar el modelo lineal que se obtiene del análisis de regresión, el cual explica la variación de la concentración recuperada que esta en función de la concentración adicionada. Dicha ecuación es la siguiente:

$$\text{Conc Recup} = -1.04781 + 1.01188 * \text{Conc Adic}$$

Para observar mejor este parámetro de linealidad entre la concentración recuperada contra la concentración adicionada, se presenta el Gráfico 7:

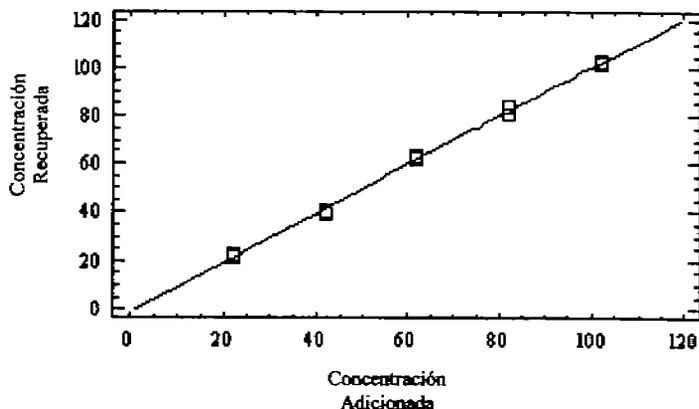


Gráfico 7. Linealidad entre la concentración recuperada y la Concentración adicionada.

Para este análisis es importante mencionar los parámetros estadísticos de regresión; que se muestran en la Tabla 13.

Los parámetros obtenidos en la Tabla 13, arrojan la siguiente información; el Coeficiente de Correlación de 99.9% muestra que hay una fuerte relación lineal entre las variables de este estudio; mientras que el coeficiente de determinación de 0.998, muestra que la variación de la concentración recuperada esta en función de la concentración adicionada

La pendiente es cercana a 1, lo que muestra que la linealidad del método es correcta y un intercepto cercano de 0.

El coeficiente de Variación es de 2.89%; por lo tanto, es menor al 5% por lo que esta dentro de los criterios de aceptación para la linealidad del método, establecidos en la Guía de Validación.

Tabla 13. Parámetros estadísticos de la Concentración Recuperada para Se Cist.

Pendiente (m)	1.012
Intercepto (b)	-1.048
Coefficiente de Correlación (r)	0.999
Coefficiente de Determinación (r²)	0.998
C.V (%)	2.899
Intervalos de Confianza para b 95%	L.I.C, L.S.C 0.988, 1.007

A continuación se establecen las hipótesis que permiten corroborar que existe una relación lineal entre la concentración recuperada contra la concentración adicionada:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

H_A: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Criterio de aceptación

Sí $F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H₀.

Sí $F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H₀.

Para determinar si la linealidad del método cumple con las hipótesis antes planteadas, se realiza una Tabla de ANOVA para seleno cistina; la cuál arroja los siguientes resultados:

Tabla 14. ANOVA para Seleno Cistina Recuperado.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l	Media de Cuadrados	F _{calculada}	F _{crítica}
Regresión	12286.7	1	12286.7	8991.77	1.2077E-19
Residuales	17.764	13	1.366		
Total	12304.5	14			

Según las hipótesis planteadas y los resultados obtenidos en la Tabla 18, de ANOVA se observa que la F_{cal} es mayor a la $F_{crítica}$, rechazándose la hipótesis nula; por lo tanto existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Otro de los parámetros de estudio son los residuales; los cuales permiten determinar si hay relación significativa entre los resultados; analizándose con la obtención de la estadística de D.W. y para que su valor sea aceptable debe ser mayor de 1.4; obteniéndose un valor de D.W igual a 1.6451, en este análisis; por lo tanto, en esta prueba estadística de residuales no hay una relación significativa en el orden en el cuál aparecen los resultados. Este fenómeno se visualiza mejor en la Gráfica 8 para residuales.

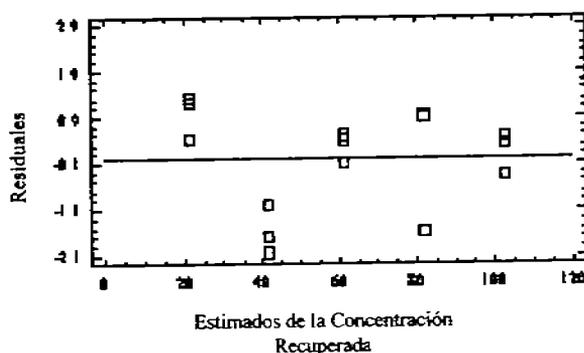


Gráfico 8. Residuales para Seleno Cistina en la linealidad del método.

El Gráfico 9, permite ver de mejor manera el comportamiento homogéneo que presentan los valores observados con respecto a los estimados.

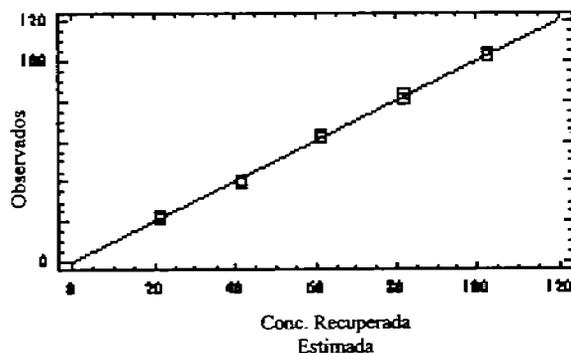


Gráfico 9. Concentración recuperada para Seleno Cistina

También se realizó la prueba del intercepto dada por la recta y de la cuál se establecen las siguientes hipótesis.

H_0 : Si $b=0$ La ordenada al origen es cero.

H_A : Si $b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación

Si $t_{cal} < t_{critico}$ No se rechaza H_0 .

Si $t_{cal} > t_{critico}$ Se rechaza H_0 .

Para esta prueba se realizó un análisis de regresión en el que la variable dependiente es la Concentración recuperada y la variable independiente es la Concentración adicionada; representada por este modelo lineal $Y = a + b \cdot X$.

En la Tabla 15, se muestran los resultados obtenidos para el intercepto; en la cuál, se observa que la $t_{calculada}$ es menor a la $t_{critica}$ por lo que de acuerdo a lo establecido en las hipótesis planteadas para el intercepto, H_0 no se rechaza; por lo tanto, la ordenada al origen es cero. En cuanto a la pendiente esta es de 1; por lo tanto, si cumple con los parámetros establecidos, para la linealidad del método.

Tabla 15. Parámetros Estadísticos para el intercepto en la linealidad del método de Seleno Cistina.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	$t_{calculada}$	$t_{critica}$	P-valor
Intercepto	-1.048	0.728	-1.439	2.145	0.174
Pendiente	1.012	0.011	94.825		0.000

En la Tabla 16, se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para el porcentaje de recobro; de los cuales se determinó, que el coeficiente de variación es menor de 5%; por lo que, esta dentro del criterio de aceptación, además de que los porcentaje de recobro obtenidos, se encuentran dentro de los límites tanto superior como inferior, además de que muestra resultados óptimos de 99.26% de recobro.

Tabla 16. Parámetros estadísticos para el %Recobro de linealidad del método para Seleno Cistina.

Promedio del %Recobro	99.263
Desviación Estándar (S)	2.610
C.V (%)	2.629
Intervalo de Confianza para la Media poblacional (%)	L.I.C, L.S.C 97.817, 100.708

4.5.3 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de la exactitud y repetibilidad; se trabajo con los porcentajes de recobro obtenidos, de 1 ensayo; que consiste, en adicionarle a 1ml de líquido ruminal una concentración de 60ppm del estándar de Seleno Cistina. Este ensayo se realizo por sextuplicado y del cual se obtuvieron, los resultados mostrados en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados obtenidos de % Recobro para exactitud y repetibilidad de Seleno Cistina.

Concentración Adicionada (ppm)	% Recobro
60	99.166
60	98.814
60	99.799
60	99.169
60	100.572
60	99.122

Además se realizó una prueba estadística de t aun nivel de significancia del 99.99% o una α 0.001; que permiten determinar la variabilidad que existen entre la cantidad adicionada y el porcentaje de recobro; por lo que, se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: Si el %Recobro = 100%. El porcentaje de recobro es igual al 100% para Seleno Cistina.

HA: Si el %Recobro \neq 100% El porcentaje de recobro es diferente de 100% para Seleno Cistina.

Criterio de Aceptación

Si $t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza Ho.

Si $t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza Ho.

Para poder evaluar estas hipótesis, se determinaron los siguientes parámetros expuestos en la Tabla 18; en los cuales, se observa que la t_{cal} es menor a la $t_{critica}$; por lo tanto, el método es repetible aun nivel de confianza del 99.99%; además, de que los

resultados de % de recobro se encuentran dentro de los límites tanto inferior como superior, además de que el promedio se encuentra dentro de este mismo rango.

Para determinar si es exacto se obtuvo el C.V. el cuál es de 1.46; por lo tanto, es menor a 5%; y con estos criterios se determina la exactitud y repetibilidad de este método para Seleno Cistina.

Tabla 18. Resultados obtenidos para determinar exactitud y repetibilidad para Se Cis

Promedio	99.440
Desviación Estándar (S)	0.641
C.V (%)	0.644
t_{cal}	2.140
$t_{critica}$	6.869
Intervalos de Confianzas al 99.99%	LI.C , LS.C 97.644,101.237

4.5.4 PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de estos parámetros se utilizó un análisis estadístico llamado modelo factorial jerárquico; en el cuál, se usaron los resultados obtenidos del % Recobro de Seleno Cistina a un nivel de concentración de 60ppm; siendo, analizados por dos días y dos analistas diferentes. Obteniendo los resultados de la Tabla 19.

Tabla 19. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar precisión y reproducibilidad para Seleno Cistina.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	66.5872	63.5452
	64.4636	64.3248
	64.3561	64.7507
Día 2	65.7449	65.7584
	64.0306	65.1491
	64.6841	65.0585

Para este análisis también se establecen hipótesis, las cuales permiten determinar si existen diferencias entre los porcentajes de recobro de Seleno Cistina obtenidos entre analistas y los días analizados.

Dichas hipótesis son:

Ho: No existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

HA: Existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación

Si $F_{cal} < F_{tab}$ No se rechaza Ho.

Si $F_{cal} > F_{tab}$ Se rechaza Ho.

Para determinar que criterio de aceptación cumple este análisis, se realizó un Análisis de Varianza con los resultados de porcentaje de recobro para Seleno Cistina; presentados en la Tabla 20.

Con dicho Análisis de Varianza se determina que la F_{cal} es menor a la F_{tab} , por lo que no se rechaza Ho; esto significa que el método es reproducible ya que con los porcentajes de recobro obtenidos no hay efecto de los analistas ni del día en el análisis.

Tabla 20. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Seleno Cistina.

Fuente	g.l	S.C	C.M	F_{cal}	F_{tab}
Analista	1	0.136	0.136	0.135	18.513
Día	2	2.015	1.007	1.414	4.458
Error	8	5.701	0.713		
Total	11				

Para la determinación de la exactitud se determinaron los parámetros estadísticos de la Tabla 21; en la cuál, se indica que el Coeficiente de Variación obtenido es de 1.302

el cuál es menor de 5% que es límite del criterio de aceptación para muestras biológicas; por lo que, el método es si es exacto para Seleno Cistina.

Tabla 21. Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método para Se Cis.

Promedio	64.871
Desviación Estándar	0.845
C.V (%)	1.302

Solo para percibir mejor el efecto que tuvo el día y analista en este estudio se muestra el Gráfico 10; en el cuál, se observa que hay un traslapamiento de los datos tanto para día como para analista; lo cuál significa que no existe diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos para ninguna de las dos variables (día y analista), determinándose que no influye el día en que se lleve a cabo el análisis, ni el analista que lo realice.

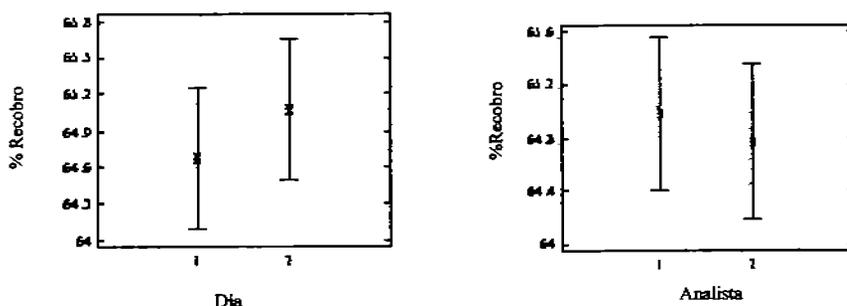


Gráfico 10. Comparación de resultados obtenidos de día y analista para Seleno Cistina con Intervalo de Confianza del 95%

4.6 SELENO METIONINA

4.6.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Al igual que para Seleno Cistina; en la validación de Seleno Metionina es importante realizar una curva de calibración la cual permita determinar si el sistema es lineal.

La curva de calibración de Seleno Metionina se preparó de la misma forma que para Seleno Cistina con un rango de concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.

Una vez preparada la curva de calibración se inyectó cada punto de la curva por triplicado.

En la Tabla 22, se observan las concentraciones con las que se trabajó y las áreas que se obtuvieron para cada una de ellas.

Tabla 22. Curva de calibración para la linealidad del sistema de Seleno Metionina.

Concentración	Áreas	Área/Conc.
20	5765	288.25
20	5846	292.3
20	5754	287.7
40	11055	276.375
40	11243	281.075
40	10887	272.175
60	16901	281.683
60	16947	282.45
60	17017	283.617
80	22787	284.838
80	22093	276.163
80	22997	287.463
100	27798	277.98
100	27925	279.25
100	27658	276.58

Para iniciar el análisis de linealidad del sistema para Seleno Metionina, se comenzó por realizar una regresión simple, del área entre la concentración.

Los resultados para la linealidad del sistema demuestran, el modelo lineal que describe la relación existente entre el área y la concentración real. La ecuación que explica dicha relación lineal, para Seleno Metionina es la siguiente:

$$\text{Área} = 176.767 + 160.908 \cdot \text{Conc. Real}$$

El Gráfico 11, muestra la relación lineal, que presentaron los resultados de Área contra Concentración para Seleno Metionina.

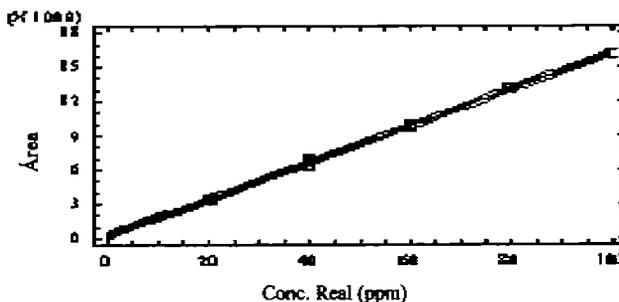


Gráfico 11. Relación lineal del Área contra la Concentración para Seleno Metionina.

En la Tabla 23, se encuentran los parámetros evaluados para la linealidad de Seleno Metionina. Los cuales explican, que el coeficiente de determinación (r^2), muestra que la linealidad del sistema tiene un valor de 99.931% en la variabilidad del área con respecto a los cambios de concentración; mientras que el coeficiente de correlación de 0.999, indica una relación relativamente fuerte entre el área y la concentración. Mientras que la estimación del error estándar, indica que la desviación estándar de los residuales es de 128.041.

Tabla 23 Parámetros de regresión simple para Seleno Metionina.

Coefficiente de Correlación	0.999
r^2	99.931
Estimación del Error Estándar	128.041

El Gráfico 12, muestra como los resultados obtenidos en la curva de calibración para linealidad del sistema de Seleno Metionina, no presentan ninguna correlación significativa.

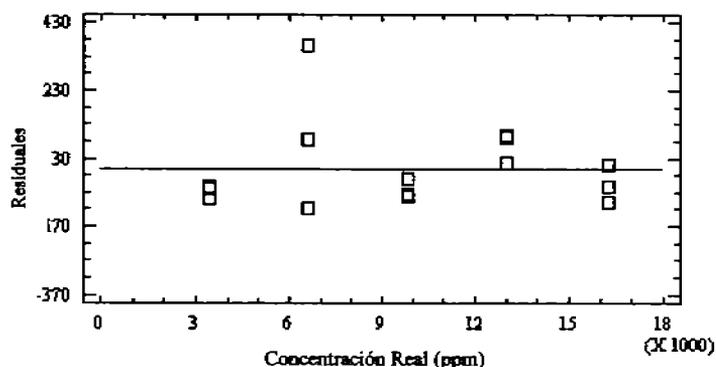


Gráfico 12. Muestra la tendencia de los residuos

También se determinó el comportamiento de los valores observados con los estimados; encontrándose que los valores observados son homogéneos y lineales; al igual, que los obtenidos en los estimados. Visualizándose en el Gráfico 13.

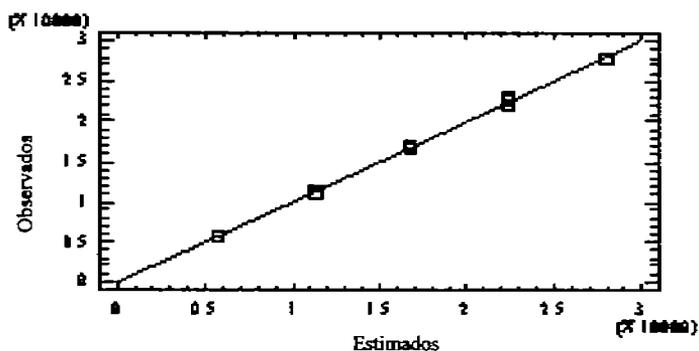


Gráfico 13. Comportamiento de los valores observados con los estimados para determinar la linealidad de Seleno Metionina.

Se realizó una tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) para Seleno Metionina con el fin de demostrar la relación que existe entre las variables estudiadas; para ello se plantean las siguientes hipótesis:

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

H_A : Existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

El criterio de aceptación para estas hipótesis es:

Sí $F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H_0 .

Sí $F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H_0 .

En la Tabla 24, de ANOVA se observa que el F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$; por lo tanto, se acepta H_A y se rechaza H_0 ; es decir, existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

Tabla 24. ANOVA para linealidad simple con un nivel de confianza del 95%.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.L.	Media de Cuadrados	F_{cal}	$F_{critica}$
Regresión	9.26563e8	1	9.26563e8	12160.22	1.08533e-20
Residuales	990551.0	13	76196.2		
Total	9.27554e8	14			

Posteriormente se evaluó la prueba del intercepto dada por la recta; de la cuál se deriva las siguientes hipótesis:

H_0 : Sí $b=0$ la ordenada al origen es 0

H_A : Sí $b \neq 0$ la ordenada al origen es diferente de 0

Los criterios de aceptación para dichas hipótesis son:

$$t_{\text{cal}} < t_{\text{crítica}} \text{ No se rechaza } H_0$$

$$t_{\text{cal}} > t_{\text{crítica}} \text{ Se rechaza } H_0$$

Análisis de regresión para el modelo lineal para el intercepto $Y = a + b \cdot X$

En la que la variable dependiente es el Área.

La variable Independiente es la Concentración real.

Como se aprecia en la Tabla 25, la t_{cal} es menor a la $t_{\text{crítica}}$, por lo que al considerar los criterios de aceptación de las hipótesis planteadas para el intercepto, la hipótesis nula no se rechaza; es decir, la ordenada al origen sí incluye al cero.

En cuanto a los límites presentados en la Tabla 25, de regresión, para el modelo lineal, la mayoría de los datos se encuentran dentro de los límites tanto superior como inferior.

Tabla 25. Regresión del modelo lineal para el intercepto para Seleno Metionina.

Parámetros	Estimado	Error Estándar	t_{cal}	$t_{\text{crítica}}$	P-valor	L.L.C	L.S.C
Intercepto	172.467	167.149	1.032	2.145	0.321	277.915	282.535
Pendiente	277.873	2.519	110.273				

Posteriormente se realizó un análisis de residuales, con el objetivo de determinar que los resultados obtenidos para la linealidad de Seleno Metionina, no presentan una correlación significativa.

La Tabla 26, muestra que la R-cuadrada indica la linealidad del modelo con un 99.339% y que la variabilidad en el área, se debe a los cambios de concentración; mientras que el error estándar del estimado aporta información acerca de la desviación estándar de los residuales con un valor de 0.993; así como, el error absoluto de la Media, nos da el valor medio de los residuales, siendo de 0.713.

El valor de D.W para Seleno Metionina es de 2.485 lo que permite determinar que no hay ninguna correlación significativa, según el orden de aparición de los datos; ya que para que este fenómeno se presente la prueba estadística de Durbin-Watson (DW) debe ser mayor de 1.4 y una probabilidad (P) mayor de 0.05, como lo es en este caso.

Tabla 26. Análisis de Residuales para Seleno Metionina.

R-cuadrada =	99.885 Porcentaje
Error Estándar del Estimado =	0.993
Error absoluto de Media =	0.713
Estadística de Durbin- Watson =	2.485

Se plantean las siguientes hipótesis para determinar que la concentración adicionada es lineal

H₀: El sistema presenta una correlación significativa en la propiedad medida

H_A: El sistema no presenta una correlación significativa en la propiedad medida

Criterio de aceptación

$F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H₀

$F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H₀

Por lo tanto se presenta la Tabla 27, de Análisis de Varianza (ANOVA) para analizar a los residuales; proporcionando información acerca de que no existe una correlación estadísticamente significativa entre los residuales; debido a que la F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$.

Tabla 27. Análisis de Varianza para los Residuales para Seleno Metionina.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l	Media de cuadrados	$F_{calculada}$	$F_{critica}$
Área. Real	12000.0	1	12000.0	12160.15	2.145
Residuales	12.829	13	0.987		
Total (correg)	12012.8	14			

El Gráfico 14, corrobora que el sistema no presenta una correlación significativa, en el análisis de residuos para Seleno Metionina.

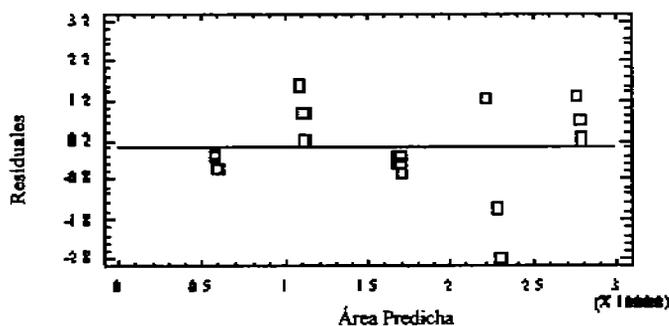


Gráfico 14. Análisis de Residuales para Seleno Metionina.

En la Gráfica 15, se realiza un análisis de variable múltiple, que permite calcular varios parámetros estadísticos de interés como las correlaciones, un parcial de correlaciones; entre todas las variables analizadas, para la Seleno Metionina; dicho gráfico permite observar que no hay correlaciones entre ninguna, por la homogeneidad de los resultados y su dispersión entre variable y variable.

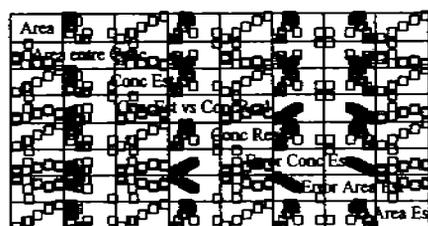


Gráfico 15. Correlación entre las variables en estudio
Para Seleno Metionina.

Así como también se muestra que no hay correlaciones entre el error de la concentración estimada, con el error del área estimada; tal como, se muestra en el Gráfico 16.

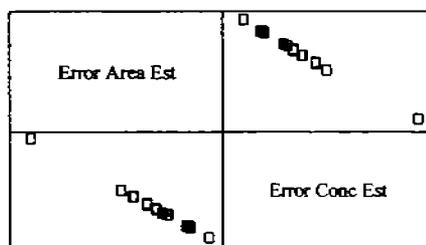


Gráfico 16. Correlación entre el Error de la Concentración Estimada

En la Tabla 28; se evalúan los parámetros estadísticos, para las dos variables anteriores (error de la concentración estimada y error del área estimada); en la cual, se determina la medida de tendencia central, medida de variabilidad y medida de forma.

Así como otros dos parámetros estadísticos importantes como la skewness estandarizada y la kurtosis estandarizada; ya que, con estos se puede determinar si las variables presentan una distribución normal; siendo el criterio de aceptación valores que se encuentren en un rango de -2 a $+2$; por lo que, en este caso las variables se encuentran dentro de este rango, presentando una distribución normal en sus datos.

Tabla 28. Parámetros estadísticos para el Error del Área estimada y el Error de la Concentración estimada para Seleno Metionina.

Parámetro	Error Área estimada	Error Conc. estimada
Estimado	15	15
Promedio	0.009	0.017
Varianza	2.652	2.688
Desviación Estándar	1.628	1.639
Mínimo	-2.586	-3.602
Máximo	3.678	2.675
Rango	6.264	6.277
Skewness Estándar	0.929	-0.794
Kurtosis Estándar	0.435	0.331

4.6.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA SELENO METIONINA

Posteriormente se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para evaluar si el área (propiedad medida), se encuentra dentro del intervalo de trabajo y si es preciso; para ello se realizó un sextuplicado de la concentración de 60ppm, trabajada en la linealidad del sistema para Seleno Metionina, obteniendo un coeficiente de variación menor de 2; por lo tanto el sistema es preciso. En la Tabla 29, se encuentran los resultados estadísticos obtenidos del anterior análisis.

Tabla 29. Datos estadísticos para evaluar la precisión del sistema de Se Met.

Promedio del Área/ Conc.	281.859
Desv. Estándar	5.570
C.V (%)	1.976

4.6.2 LINEALIDAD DEL METODO PARA SELENO METIONINA

La linealidad del método para Seleno Metionina se realizó, con 1ml de muestra (líquido ruminal); a la cuál, se le añadieron las siguientes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100 ppm), respectivamente, para cada ml. y las cuales se aforaron a 5ml. Este ensayo se realizó por triplicado.

En la determinación de la linealidad del método de Seleno Metionina se trabajo con concentraciones adicionadas y recuperadas; de estas concentraciones, se obtuvo el porcentaje de recobro, con el cuál se realizó este análisis. En la Tabla 30, se observan estos resultados.

Tabla 30. Linealidad del método de Seleno Metionina que muestra la Concentración adicionada, Recuperada y % Recobro.

Sistema	Conc. Adic	Conc. Recup	%Recobro
1	22.149	22.304	100.698
2	22.149	22.407	101.165
3	22.149	22.145	99.979
4	42.149	42.145	99.991
5	42.149	43.026	102.079
6	42.149	42.759	101.449
7	62.149	62.068	99.869
8	62.149	62.063	99.862
9	62.149	63.649	102.415
10	82.149	83.831	102.048
11	82.149	82.181	100.039
12	82.149	83.983	102.233
13	102.149	103.237	101.065
14	102.149	102.787	100.625
15	102.149	103.399	101.223

Para la linealidad del método de Seleno Metionina es importante determinar el modelo lineal que se obtiene del análisis de regresión, el cual explica que la variación de la Concentración Recuperada esta en función de la Concentración Adicionada. Dicho modelo es el siguiente:

$$\text{Conc Recup} = -0.0957829 + 1.012 \cdot \text{Conc Adic}$$

Con el Gráfico 17, se observa mejor la linealidad existente entre la concentración recuperada y la concentración adicionada.

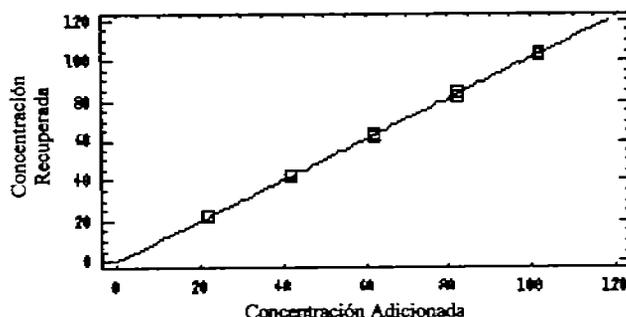


Gráfico 17. Linealidad entre la Concentración Recuperada y la Concentración Adicionada.

Los parámetros estadísticos de regresión, obtenidos para Seleno Metionina; se muestran en la Tabla 31; en la que se observa la siguiente información: un Coeficiente de Determinación de 99.961%, indica que la variabilidad en la Concentración Recuperada es proporcional a la Concentración Adicionada; mientras que el Coeficiente de Correlación de 0.999, muestra que hay una fuerte relación lineal entre las variables de este estudio.

La pendiente es de 1, indicando que la linealidad del método es correcta y un intercepto cercano de 0, indica que la ordenada al origen sí incluye al cero.

Los valores anteriores, también se encuentran dentro de los límites de confianza; obtenidos a un nivel de significancia del 95%

El coeficiente de Variación obtenido, es de 3.63%; valor que se encuentra dentro del criterio de aceptación para linealidad del método ($\leq 5\%$).

Tabla 31. Parámetros estadísticos de regresión para Seleno Metionina.

Pendiente (m)	1.012
Intercepto (b)	-0.096
Coefficiente de Correlación (r)	0.999
Coefficiente de Determinación (r²)	0.999
C.V (%)	3.632
Intervalos de Confianza para b 95%	L.I.C, L.S.C 1.006, 1.015

Posteriormente se establecen las hipótesis que permiten corroborar que existe una relación lineal entre la Concentración Recuperada contra la Concentración Adicionada:

H₀: No existe una relación lineal entre la Concentración Adicionada y la Concentración Recuperada.

H_A: Existe una relación lineal entre la Concentración Adicionada y la Concentración Recuperada.

Criterio de aceptación

Sí $F_{\text{cal}} < F_{\text{critica}}$ No se rechaza H₀.

Sí $F_{\text{cal}} > F_{\text{critica}}$ Se rechaza H₀.

Para determinar si la linealidad del método cumple con las hipótesis antes planteadas, se realiza una tabla de ANOVA para Seleno Metionina; la cual arroja los siguientes resultados:

Tabla 32. ANOVA para Seleno Metionina Recuperado.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F _{calculada}	F _{crítica}
Regresión	12289.7	1	12289.7	33423.76	9.4331E-24
Residuales	4.780	13	0.368		
Total	12294.5	14			

Según las hipótesis planteadas y los resultados obtenidos en la Tabla 32, de ANOVA se observa que la F_{cal} es mayor a la $F_{crítica}$ rechazándose la hipótesis nula; por lo que existe una relación lineal entre la Concentración Adicionada y la Concentración Recuperada.

Después de que se determinó que la Concentración Recuperada es proporcional a la Concentración Adicionada, se realizó un estudio de residuales; el cuál permite determinar si existe alguna relación significativa entre los resultados. Para ello, se obtuvo uno de los parámetros estadísticos más importantes, el valor obtenido de la estadística de Durbin-Watson (DW) y el cuál debe ser mayor a 1.4; obteniéndose en este análisis un valor de $DW = 2.487$, que indica que en los residuales, no hay una relación significativa en el orden en el cuál aparecen los resultados. Para una mejor visualización de este fenómeno a continuación se muestra la Gráfica 18, de residuales obtenida para Seleno Metionina.

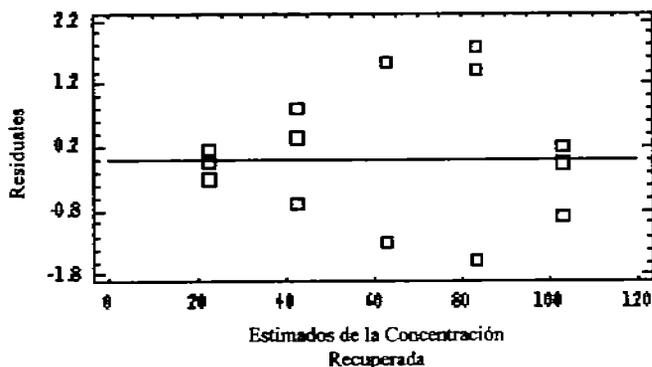


Gráfico 18. Residuales para Seleno Metionina en la linealidad del método.

Una vez que se estableció que no existe una relación significativa en el orden de aparición de los resultados, se obtiene el Gráfico 19, que muestra el comportamiento homogéneo que presentan los valores observados con los estimados; indicando que no hay diferencia entre los resultados esperados con los obtenidos.

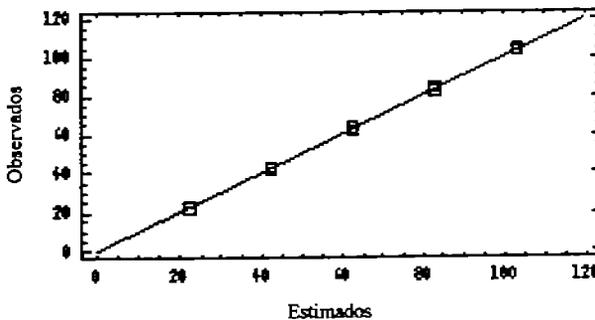


Gráfico 19. Concentración recuperada de los observados y los estimados para Seleno Metionina.

Se realizó también la prueba del intercepto dada por la recta y de la cuál se establecen las siguientes hipótesis.

Ho: Sí $b=0$ La ordenada al origen es cero.

HA: Sí $b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación

Sí $t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza Ho.

Sí $t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza Ho.

Para esta prueba se realizó un análisis de regresión en el que la variable dependiente es la Concentración Recuperada y la variable independiente es la Concentración Adicionada; representada por este modelo lineal $Y = a + b \cdot X$.

La Tabla 33 permite observar que la $t_{calculada}$ es menor que la $t_{critica}$; por lo que, la hipótesis nula no se rechaza; es decir, la ordenada al origen si incluye al cero. Mientras que la pendiente es de 1; por lo que, si cumple con los parámetros establecidos para linealidad del método de Seleno Metionina.

En la Tabla 33 se muestra los resultados obtenidos para el intercepto.

Tabla 33. Para el intercepto en la linealidad del método de Seleno Metionina.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	$t_{calculada}$	$t_{critica}$	P-valor
Intercepto	-0.09578	0.37797	-0.25341	2.144788	0.8039
Pendiente	1.012	0.005535	182.822		0.0000

En la Tabla 34, se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para el porcentaje de recobro; en los cuales se observa que el coeficiente de variación es menor de 5%; por lo que, esta dentro del criterio de aceptación; mientras que, los resultados de porcentaje de recobro obtenidos se encuentran dentro de los límites tanto superior como inferior.

Tabla 34. Parámetros estadísticos para el %Recobro de linealidad del método para Seleno Metionina.

Promedio del %Recobro	100.0827
Desviación Estándar (S)	0.92004
C.V (%)	0.91109
Intervalo de Confianza para la Media poblacional (%)	LI.C, LS.C 97.8166,100.7068

4.6.3 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de la exactitud y repetibilidad, se trabajo con los porcentajes de recobro obtenidos, de 1 ensayo; que consiste, en adicionarle a 1ml. de liquido ruminal, estándar de Seleno Metionina con una concentración de 60 ppm. Dicho ensayo se realizo por sextuplicado; y del cual, se obtuvieron, los resultados mostrados en la Tabla 35.

Tabla 35. Resultados obtenidos de % Recobro para exactitud y repetibilidad de Seleno Metionina.

Concentración Adicionada (ppm)	% Recobro
60	101.952
60	98.668
60	101.131
60	99.346
60	99.194
60	101.933

Se realizó la prueba estadística de t aun nivel de significancia del 99.99% o una α 0.001; que permiten determinar la variabilidad que existen entre la cantidad adicionada y el porcentaje de recobro; por lo que se plantean las siguientes hipótesis:

H₀: Si el %Recobro = 100%. El porcentaje de recobro es igual al 100% para Seleno Metionina.

H_A: Si el %Recobro \neq 100% El porcentaje de recobro es diferente de 100% para Seleno Metionina.

Criterio de Aceptación

Si $t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza H₀.

Si $t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza H₀.

Para la evaluación de estas hipótesis se determinaron los parámetros expuestos en la Tabla 36; en los cuales se observa que la t_{cal} es menor a la $t_{critica}$; por lo tanto, el método es repetible aun nivel de confianza del 99.99%; mientras que, los resultados de % de recobro se encuentran dentro de los límites tanto inferior como superior, también el promedio se encuentra dentro de este mismo rango, por lo que se confirma que existe una concordancia entre los resultados de este análisis.

Para determinar si es exacto se obtuvo el C.V. el cuál es de 1.46; por lo tanto es menor a 5%; y con estos criterios se determina la exactitud y repetibilidad de este método para Seleno Metionina.

Tabla 36. Resultados obtenidos para determinar exactitud y repetibilidad para Seleno Metionina.

Promedio	100.371
Desviación Estándar (S)	1.473
C.V (%)	1.468
t_{cal}	0.616
$t_{critica}$	6.869
Intervalos de Confianzas al 99.99%	L.I.C , L.S.C 96.239,104.502

4.6.4 PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de la precisión y reproducibilidad, se utilizó una análisis estadístico, llamado modelo factorial jerárquico; el cuál se evaluó, con los resultados obtenidos del % Recobro de Seleno Metionina a una concentración de 60ppm, siendo analizados por dos días y dos analistas diferentes. De los cuales se obtienen los resultados de la Tabla 37.

Tabla 37. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y reproducibilidad para Seleno Metionina.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	69.529	69.295
	70.566	70.168
	69.119	69.851
Día 2	70.494	70.875
	69.224	68.885
	68.787	71.374

Para este análisis se establecen las siguientes hipótesis; las cuales permiten determinar si existe diferencia entre los porcentajes de recobro de Seleno Metionina, obtenidos entre analistas y los días analizados.

Dichas hipótesis son:

H_0 : No existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

H_A : Existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación

$\text{Si } F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ No se rechaza H_0 .

$\text{Si } F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ Se rechaza H_0 .

Para determinar que criterio de aceptación cumple este análisis, se realizó un Análisis de Varianza con los resultados de porcentaje de recobro para Seleno Metionina; presentados en la Tabla 37.

En la Tabla 38, se presenta el Análisis de Varianza, el cual demuestra que la F_{cal} es menor a la F_{tab} , por lo que el método es reproducible, ya que no se rechaza H_0 ; además de que se observa que los porcentajes de recobro obtenidos no presentan efecto entre analistas, ni entre días en el análisis.

Tabla 38. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Seleno Metionina.

Fuente	g.l	S.C	C.M	F _{cal}	F _{tab}
Analista	1	0.620	0.620	1.954	18.513
Día	2	0.635	0.317	0.388	4.459
Error	8	6.546	0.818		
Total	11				

Con este análisis se determina paralelamente la exactitud obteniendo los parámetros estadísticos expuestos en la Tabla 39; la cuál demuestra que el Coeficiente de Variación obtenido es de 1.206; el cuál es menor de 5% que es límite del criterio de aceptación para muestras biológicas; por lo que, el método es sí es exacto para Seleno Metionina.

Tabla 39. Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método para Seleno Metionina.

Promedio	69.847
Desviación Estándar	0.842
C.V (%)	1.206

Para percibir mejor el efecto que tuvo el día y analista en este estudio se muestra el Gráfico 20, en los que se puede analizar que no existe diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos, tanto para día como para analista.

Como se aprecia en este Gráfico 20, los valores de porcentaje de recobro para el efecto Día se traslapan para los dos diferentes días; por lo que no importa el día en el que se trabaje se obtiene resultados similares.

En cuanto al efecto analista, también se prueba que no hay diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos por cada analista ya que también se traslapan los resultados; por lo que tampoco importa que analista lleve a cabo el análisis.

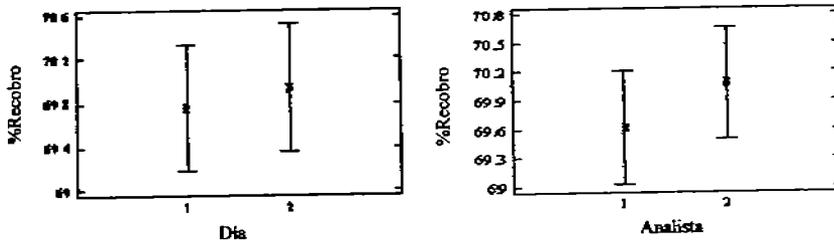


Gráfico 20. Comparación de resultados obtenidos de día y analista para Seleno Metionina con Intervalo de Confianza del 95%

4.7 SELENITO

4.7.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Al igual que para Seleno compuestos anteriores; en la validación de Selenito es importante realizar una curva de calibración la cual permita determinar si el sistema es lineal.

Dicha Curva de Calibración, se preparó de la misma forma que para los Seleno compuestos anteriores, a un rango de concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100ppm.

Una vez preparada la curva de calibración se inyectó cada punto de la curva por triplicado.

En la Tabla 40, se observan las concentraciones a las cuales se llevo a cabo dicha curva de calibración y las áreas obtenidas para cada concentración.

Tabla 40. Curva de calibración para la linealidad del sistema de Selenito.

Concentración	Area	Area/ Conc.
20	3339	166.95
20	3333	166.65
20	3306	165.3
40	6497	162.425
40	6696	167.4
40	6978	174.45
60	9754	162.567
60	9802	163.367
60	9751	162.517
80	13148	164.35
80	13065	163.313
80	13141	164.263
100	16212	162.12
100	16168	161.68
100	16279	162.79

Para el análisis de linealidad del sistema para Selenito, se comenzó por realizar una regresión simple del área entre la concentración.

Los resultados para la linealidad del sistema demuestran, el modelo lineal que describe la relación que existe entre el área y la concentración real. Mientras que la ecuación que explica dicha relación lineal para Selenito es la siguiente:

$$\text{Área} = 176.767 + 160.908 \cdot \text{Conc. Real}$$

El Gráfico 21, muestra la relación lineal que presentaron los resultados de Área contra Concentración para Selenito.

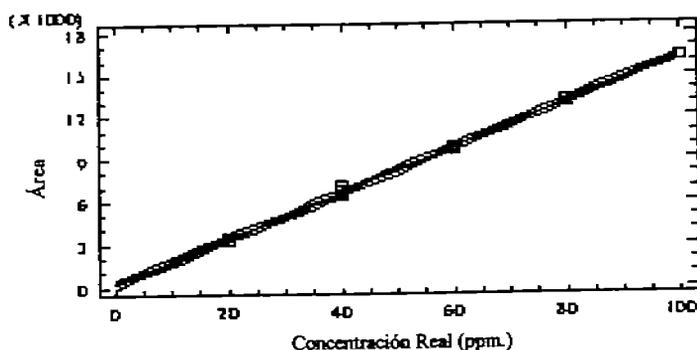


Gráfico 21. Relación lineal del Área contra la Concentración para Selenito.

Los parámetros estadísticos, evaluados para la linealidad de Selenito, se muestran en la Tabla 41. La cual señala, que la r^2 (coeficiente de determinación), indica la linealidad del sistema con un 99.931% y que la variabilidad en el área, se debe a los cambios de concentración; mientras que el coeficiente de correlación igual 0.999 indica una relación relativamente fuerte entre el área y la concentración. La estimación del error estándar, tiene un valor de 128.041, mostrando la desviación estándar de los residuales.

Tabla 41. Parámetros de regresión simple para Selenito.

Coefficiente de Correlación	0.999
r^2	99.931
Estimación del Error Estándar	128.041

Para probar que no presentan ninguna tendencia lineal significativa los residuales obtenidos, en la linealidad del sistema para Selenito; se presenta el Gráfico 22.

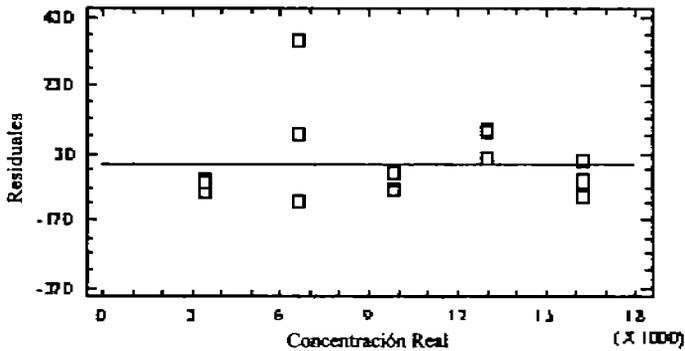


Gráfico 22. Muestra la tendencia de los residuales

También se determinó el comportamiento de los valores observados con los estimados; con el fin de observar la homogeneidad de los resultados esperados con los obtenidos experimentalmente; que ayudan a corroborar una vez más la linealidad de este estudio. Como se muestra en el Gráfico 23.

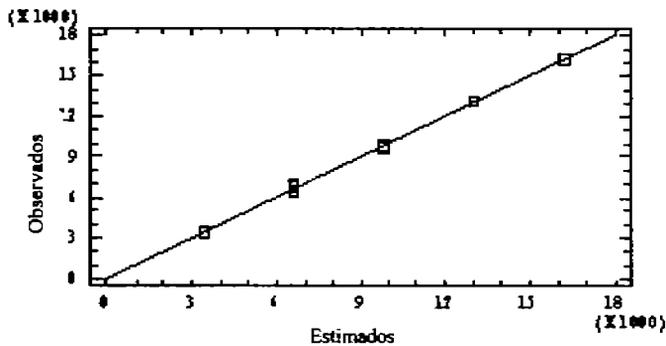


Gráfico 23. Comportamiento de los valores observados con los estimados para determinar la linealidad de Selenito.

Se realizó una Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) para Selenito con el fin de demostrar la relación que existe entre las variables estudiadas; para ello se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

HA: Existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

El criterio de aceptación para estas hipótesis son:

Sí $F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza Ho.

Sí $F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza Ho.

En la Tabla 42, de ANOVA se observa que el F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$; por lo que, se acepta HA; por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

Tabla 42. ANOVA para linealidad simple con un nivel de confianza del 95%.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.L	Media de Cuadrados	F_{cal}	$F_{critica}$
Regresión	3.10698E8	1	3.10698E8	18951.21	3.246E-21
Residuales	213130.0	13	16394.6		
Total	3.10911E8	14			

Posteriormente se evaluó, la prueba del intercepto dada por la recta; de la cuál se derivan las siguientes hipótesis:

Ho: Sí $b=0$ la ordenada al origen es 0

HA: Sí $b \neq 0$ la ordenada al origen es diferente de 0

Los criterios de aceptación para dichas hipótesis son:

$t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza Ho

$t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza Ho

Análisis de regresión para el modelo lineal para el intercepto $Y = a + b \cdot X$

En la que la variable dependiente es el Área

La variable Independiente es la Concentración real

Como se aprecia en la Tabla 43, la t_{cal} es menor a la $t_{crítica}$, por lo que al considerar los criterios de aceptación de las hipótesis planteadas para el intercepto; la hipótesis nula no se rechaza; por lo que, la ordenada al origen si incluye al cero.

En cuanto a los límites presentados en la Tabla 43; la mayoría de los datos se encuentran dentro de los Límites de Confianza.

Tabla 43. Regresión del modelo lineal para el intercepto para Selenito.

Parámetros	Estimado	Error Estándar	t_{cal}	$t_{crítica}$	P-valor	L.I.C	L.S.C
Intercepto	176.767	77.533	2.07989	2.144788	0.0401	162.1001	164.5375
Pendiente	160.908	1.16885	137.663				

Después de que se determinó, que el modelo es lineal y que cumple con los parámetros de linealidad, Se realizó un análisis de residuales.

La Tabla 44, muestra que la R-cuadrada, con un valor de 99.926%; señala la linealidad del sistema y que la variabilidad en el área se debe a cambios en la concentración; mientras, que el error estándar del estimado aporta información acerca de la desviación estándar de los residuales con un valor de 0.795; y que el error absoluto de la Media es de 0.545, indicando el valor medio de los residuales.

El valor de D.W para Selenito es de 1.892 lo que permite determinar que no hay ninguna correlación significativa, según el orden de aparición de los datos; ya que para que este fenómeno se presente la prueba estadística de Durbin-Watson (DW) debe ser mayor de 1.4 y una probabilidad (P) mayor de 0.05, como lo es en este caso.

Tabla 44. Análisis de Residuales para Selenito.

R-cuadrada =	99.926 Porcentaje
Error Estándar del Estimado =	0.795
Error absoluto de Media =	0.545
Estadística de Durbin- Watson =	1.892

Se plantean las siguientes hipótesis para determinar la linealidad en la Concentración Adicionada.

H₀: El sistema presenta una correlación significativa en la propiedad medida

H_A: El sistema no presenta una correlación significativa en la propiedad medida

Criterio de Aceptación

$F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H₀

$F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H₀

La Tabla 45, de Análisis de Varianza (ANOVA), para analizar a los residuales; proporciona información, acerca de que no existe una correlación estadísticamente significativa entre los residuales; debido a que la F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$.

Tabla 45. Análisis de Varianza para los Residuales.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.L	Media de cuadrados	$F_{calculada}$	$F_{critica}$
Área. Real	11991.8	1	11991.8	18951.21	2.1447
Residuales	8.22602	13	0.632771		
Total (correg)	12000.0	14			

El Gráfico 24; permite observar de forma más clara, que el sistema no presenta una correlación significativa; en el análisis de residuos para Selenito.

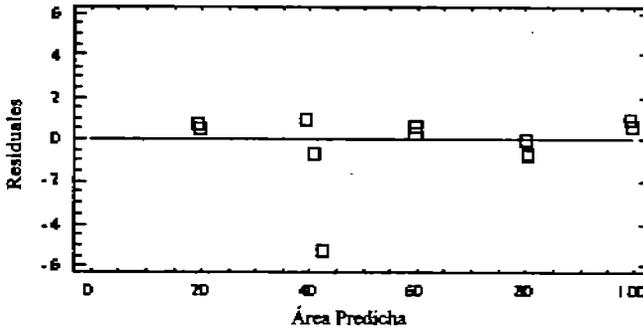


Gráfico 24. Análisis de Residuales para Selenito.

Se realiza un análisis de variable múltiple, que permite calcular varios datos estadísticos de interés; como las correlaciones, un parcial de correlaciones, entre todas las variables analizadas para la Selenito y del cuál se deriva el Gráfico 25, que permite observar que no hay correlaciones entre las variables analizadas.

Este Gráfico 25, prueba de manera clara que no hay correlación entre las variables analizadas y que siguen una tendencia propia; tanto; el área, área entre concentración, Concentración Estimada, Concentración Estimada entre Concentración Real, Concentración real, ni para el Error Estimado de la Concentración ni del Área.

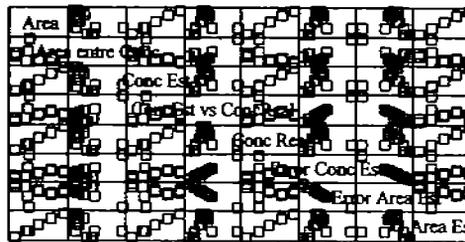


Gráfico 25. Correlación entre las variables en estudio

Así como también se muestra que no hay correlaciones entre el error de la concentración estimada, ni en el error del área estimada, observando que siguen una tendencia agrupada, pero sin relacionarse entre sí; tal como se muestra en el Gráfico 26.

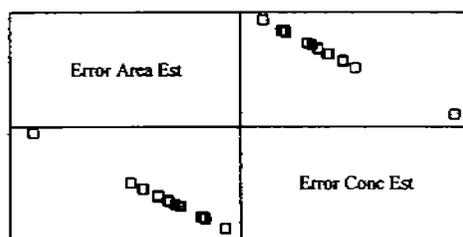


Gráfico 26. Correlación entre el error de la concentración estimada

En la Tabla 46, se evaluaron los parámetros obtenidos, del análisis estadístico realizado para el error del área estimada y el error de la concentración estimada. En los cuales aparece la medida de tendencia central, medida de variabilidad y medida de forma. Pero uno de los datos que más información aporta a este análisis es la skewness estandarizada y la kurtosis estandarizada; porque con ella se puede determinar si las variables presentan una distribución normal; siendo el criterio de aceptación valores que se encuentren dentro del rango de -2 a $+2$, para indicar que presentan dicho comportamiento; por lo que, en este análisis las variables no se encuentran dentro de este rango; esto quiere decir que existe alguna variabilidad de los datos.

Tabla 46. Parámetros estadísticos para el Error del Área estimada y el Error de la Concentración estimada para Selenito.

Parámetro	Error Área estimada	Error Conc. estimada
Estimado	15	15
Promedio	0.185	-0.167
Varianza	3.429	3.859
Desviación Estándar	1.852	1.965
Mínimo	-5.229	-2.764
Máximo	2.690	5.669
Rango	7.919	8.433
Skewness Estándar	-2.766	2.948
Kurtosis Estándar	3.847	4.221

4.7.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Posteriormente se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para evaluar si el área (propiedad medida), se encuentra dentro del intervalo de trabajo y si es precisa; para ello se realizó un sextuplicado de las concentración de 60ppm trabajada en la linealidad del sistema para Selenito, obteniendo un coeficiente de variación menor de 2; por lo tanto el sistema es preciso. En la Tabla 47, se encuentran los resultados estadísticos obtenidos del anterior análisis.

Tabla 47. Datos estadísticos para evaluar la Precisión del sistema de Selenito.

Promedio del Área/ Conc.	3.2679
Desv. Estándar	164.6760
C.V (%)	1.9844

4.7.2 LINEALIDAD DEL METODO

La linealidad del método para Selenito se realizó, con 1ml de muestra (líquido ruminal); a esta se le añadieron las siguientes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100 ppm), en cada ml, respectivamente y posteriormente se aforaron a 5ml. Este ensayo se realizó por triplicado.

En la determinación de linealidad del método para Selenito, se trabajó con concentraciones adicionadas y recuperadas; de ellas se obtuvo el porcentaje de recobro, con el cual se realizó este análisis. En la Tabla 48, se observan estos resultados.

Tabla 48. Linealidad del método de Selenito que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.

Sistema	Conc. Adic	Conc. Recup	% Recobro
1	23.459	23.746	101.2234
2	23.459	24.066	102.5875
3	23.459	24.143	102.9157
4	43.459	45.224	104.0613
5	43.459	44.852	103.2053
6	43.459	45.504	104.7056
7	63.459	64.591	101.7838
8	63.459	64.383	101.4561
9	63.459	64.258	101.2591
10	83.459	84.318	101.0292
11	83.459	85.629	102.6001
12	83.459	83.593	100.1606
13	103.459	104.4267	100.9353
14	103.459	103.8359	100.3643
15	103.459	104.0184	100.5407

Para la linealidad del método de Selenito es importante determinar el modelo lineal que se obtiene del análisis de regresión, el cual explica la variación de la concentración recuperada que esta en función de la concentración adicionada. Dicho modelo es el siguiente:

$$\text{Conc. Recup} = -0.0957829 + 1.012 * \text{Conc. Adic}$$

En el Gráfico 27, se observa la linealidad existente entre la Concentración Recuperada contra la Concentración Adicionada.

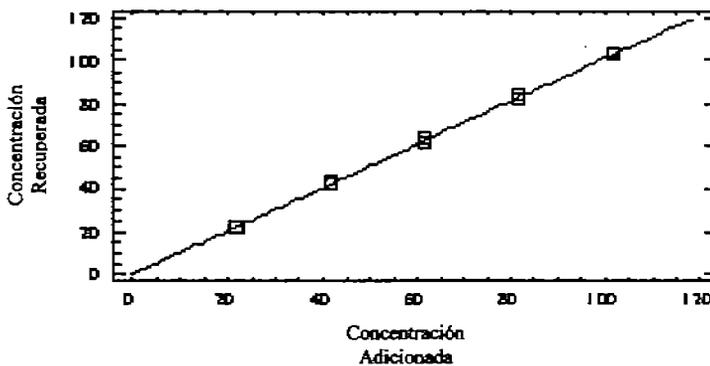


Gráfico 27. Linealidad entre la concentración recuperada y la Concentración adicionada.

En la Tabla 49; se muestran, los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión de Selenito; y los cuáles arrojan la siguiente información; el Coeficiente de Determinación de 99.96%, indica que la variabilidad en la Concentración Recuperada se deben a los cambios de la Concentración Adicionada; mientras que el coeficiente de correlación de 0.999, muestra que hay una fuerte relación lineal entre las variables de este estudio.

La pendiente es de 1 lo que muestra que la linealidad del método es correcta y un intercepto cercano de 0.

El coeficiente de Variación es de 3.79%; menor de 5%; es decir, esta dentro del criterio de aceptación para linealidad del método.

Tabla 49. Parámetros estadísticos de regresión para Selenito.

Pendiente (m)	1.012
Intercepto (b)	-0.096
Coeficiente de Correlación (r)	0.999
Coeficiente de Determinación (r ²)	0.999
C.V (%)	3.799
Intervalos de Confianza para b 95%	L.I.C, L.S.C 1.006, 1.019

Posteriormente se establecen las hipótesis que determinan si existe una relación lineal entre la Concentración Recuperada y la Concentración Adicionada:

H₀: No existe una relación lineal entre la Concentración Adicionada y la Concentración Recuperada.

H_A: Existe una relación lineal entre la Concentración Adicionada y la Concentración Recuperada.

Criterio de aceptación

Sí $F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H₀.

Sí $F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H₀.

Se realiza una Tabla, de ANOVA para Selenito, con el objetivo de determinar si la linealidad del método cumple con las hipótesis antes planteadas. Con dicha Tabla probamos que la F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$ rechazándose así la hipótesis nula; por lo que, existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada; tal como se observa en la Tabla 50.

Tabla 50. ANOVA para Selenito Recuperado.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l	Media de Cuadrados	$F_{calculada}$	$F_{critica}$
Regresión	12289.7	1	12289.7	33423.76	4.52136E-22
Residuales	4.780	13	0.368		
Total	12294.5	14			

También se realizó un estudio de residuales, el cuál permiten determinar si hay relación significativa entre los resultados. De los parámetros más importantes en este análisis es el valor obtenido de la estadística de Durbin-Watson (DW); el cuál, debe ser mayor de 1.4; obteniéndose en este análisis un valor de DW= 2.4874; lo que indica, que en los residuales no hay una relación significativa en el orden en el cuál aparecen los resultados.

La Gráfica 28, muestra que los residuales no presentan una relación significativa con los resultados obtenidos para Selenito y que su comportamiento es independiente para cada concentración.

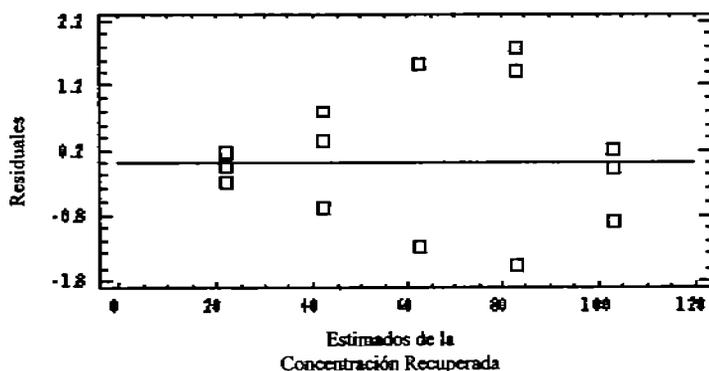


Gráfico 28. Residuales para Selenito en la linealidad del método.

En el Gráfico 29, se muestra el comportamiento homogéneo que presentan los valores observados con los estimados, así como su tendencia lineal lo que corrobora la linealidad del método para Selenito.

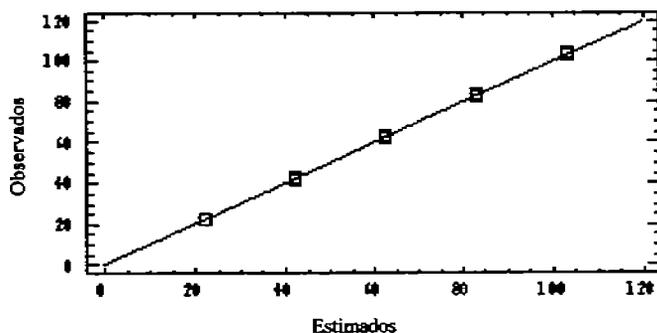


Gráfico 29. Concentración recuperada de los observados y los estimados para Selenito.

Se realizó también la prueba del intercepto dada por la recta y de la cuál se establecen las siguientes hipótesis.

Ho: $\text{Si } b=0$ La ordenada al origen es cero.

HA: $\text{Si } b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación

$\text{Si } t_{\text{cal}} < t_{\text{critica}}$ No se rechaza Ho.

$\text{Si } t_{\text{cal}} > t_{\text{critica}}$ Se rechaza Ho.

Para esta prueba se realizó un análisis de regresión en el que la variable dependiente es la Concentración Recuperada y la variable independiente es la Concentración Adicionada; representada por este modelo lineal $Y = a + b \cdot X$.

En la Tabla 51; se muestran, los resultados obtenidos para el intercepto; en los cuales, se observa que la $t_{\text{calculada}}$ es menor que la t_{critica} ; por lo tanto, la hipótesis nula no se rechaza; es decir, la ordenada al origen incluye al cero. En cuanto a la pendiente es aproximada a 1 por lo que si cumple con los parámetros establecidos.

Tabla 51. Resultados de los parámetros para el intercepto en la Linealidad del método de Selenito.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	$t_{\text{calculada}}$	t_{critica}	P-valor
Intercepto	0.127	0.405	1.803	2.145	0.016
Pendiente	0.998	0.006	171.005		0.000

En la Tabla 52; se muestran, los parámetros estadísticos obtenidos para el porcentaje de recobro; de los cuales se determinó un coeficiente de variación menor de 5%; por lo que, cumple con el criterio de aceptación; además, de que los resultados de porcentaje de recobro se encuentran dentro de los límites tanto superior como inferior.

Tabla 52. Parámetros estadísticos para el %Recobro de linealidad del método para Selenito.

Promedio del %Recobro	101.922
Desviación Estándar (S)	1.369
C.V (%)	1.343
Intervalo de Confianza para la Media poblacional (%)	L.I.C, L.S.C 100.164, 102.679

4.7.3 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de la exactitud y repetibilidad, se trabajó con el porcentaje de recobro obtenido de 1 ensayo; que consta, de la adición de un estándar de Selenito con concentración de 60ppm, a 1ml de líquido ruminal y llevándose a un aforo de 5ml. Dicho ensayo se realizó por sextuplicado; obteniéndose los resultados de la Tabla 53.

Tabla 53. Resultados obtenidos de % Recobro para exactitud y repetibilidad de Selenito.

Concentración Adicionada (ppm)	% Recobro
60	99.339
60	100.116
60	99.227
60	99.272
60	99.084
60	99.905

Se realizó la prueba estadística de t aun nivel de significancia del 99.99% o una α 0.001; que permiten determinar la variabilidad que existen entre la cantidad adicionada y el porcentaje de recobro; por lo que se plantean las siguientes hipótesis:

H_0 : Si el %Recobro = 100%. El porcentaje de recobro es igual al 100% para Selenito.

H_A : Si el %Recobro \neq 100% El porcentaje de recobro es diferente de 100% para Selenito.

Criterio de Aceptación

Si $t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza H_0 .

Si $t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza H_0 .

Para la evaluación de estas hipótesis se determinaron los parámetros expuestos en la Tabla 54; en los cuales, se observa que la t_{cal} es menor a la $t_{critica}$, por lo que, el método es repetible aun nivel de confianza del 99.99%; además de que los resultados de recobro

se encuentran dentro de los límites tanto inferior como superior, así como, el promedio. Para determinar si es exacto se obtuvo el C.V. el cuál es de 0.419; por lo tanto, es menor al 5%; y con estos criterios se determina la exactitud y repetibilidad de este método para Selenito.

Tabla 54. Resultados obtenidos para determinar exactitud y repetibilidad para Selenito.

Promedio	99.491
Desviación Estándar (S)	0.417
C.V (%)	0.419
t_{ca}	2.994
$t_{ca_{1-\alpha}}$	6.869
Intervalos de Confianzas al 99.99%	L.I.C , L.S.C 98.321,100.659

4.7.4 PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de la precisión y reproducibilidad, se utilizó un análisis estadístico llamado modelo factorial jerárquico; el cuál, se evaluó con los resultados obtenidos para % Recobro de Selenito, a una concentración de 60ppm, siendo analizados por dos días y dos analistas diferentes. Obteniendo los resultados de la Tabla 55.

Tabla 55. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y reproducibilidad para Selenito.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	70.4422	73.0638
	73.7773	71.6796
	69.5322	70.3552
Día 2	69.6529	73.286
	69.889	71.9571
	72.5931	72.5154

Se establecen las siguientes hipótesis, las cuales permiten determinar si existe diferencia entre los porcentajes de recobro de Selenito obtenidos entre analistas y los días analizados.

Dichas hipótesis son:

H₀: No existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

H_A: Existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación

Sí $F_{cal} < F_{tab}$ No se rechaza H₀.

Sí $F_{cal} > F_{tab}$ Se rechaza H₀.

Para determinar que criterio de aceptación cumple este análisis, se realizó un Análisis de Varianza con los resultados de porcentaje de recobro para Selenito; ya antes presentados en la Tabla 55.

Con el análisis de Varianza de la Tabla 56, se determina que la F_{cal} es menor a la F_{tab} , por lo que el método es reproducible, ya que no se rechaza H₀; además de que se observa que los porcentajes de recobro obtenidos no presentan efecto entre analistas, ni entre días en el análisis.

Tabla 56. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Selenito.

Fuente	g.l	S.C	C.M	F_{cal}	F_{tab}
Analista	1	4.049	4.049	5.015	18.513
Día	2	1.615	0.807	0.325	4.459
Error	8	19.888	2.486		
Total	11				

La exactitud se determina de forma simultánea con los porcentajes de recobro obtenidos anteriormente y de ellos se pueden obtener los parámetros señalados en la Tabla 57.

Dicha Tabla 57, indica que el Coeficiente de Variación obtenido es de 2.129 el cuál es menor de 5% que es límite del criterio de aceptación para muestras biológicas; por lo que, el método es si es exacto para Selenito; además de que no mucha desviación de los resultados como se muestra con el valor de la Desviación Estándar de 1.524.

Tabla 57. Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método para Selenito.

Promedio	71.562
Desviación Estándar	1.524
C.V (%)	2.129

Solo para percibir mejor el efecto que tuvo el día y analista en este estudio se muestra el Gráfico 30, en los que se puede analizar que no existe diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos para el efecto Día, ya que como se observa se traslapan los resultados para el Día 1 y 2, lo cual indica que no importa el día que se trabaje se obtienen porcentaje de recobro similares, así que el efecto Día no influye en este análisis.

En cuanto al Gráfico para el analista, se observa que también se traslapan los resultados para los dos analistas por lo que no importa que analista realice el análisis se obtienen porcentajes de recobro similares, por lo que el efecto día tampoco influye en este análisis.

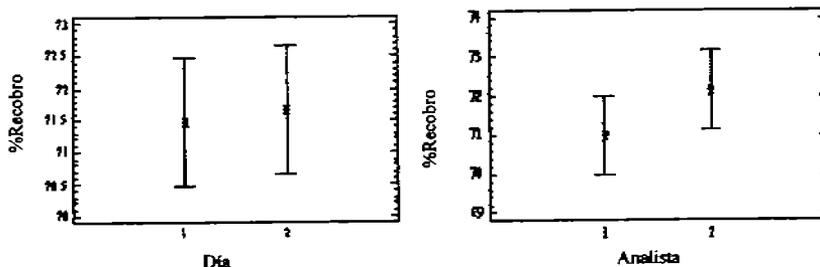


Gráfico 30. Comparación de resultados obtenidos de día y analista para Selenito con Intervalo de Confianza del 95%

4.8 SELENATO

4.8.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

La curva de calibración para Selenato, se preparó con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5ppm; para preparar cada punto de la curva, se partió de una solución stock de 1000ppm de Selenato; como se muestra en la Tabla 58.

Tabla 58. Preparación de la Curva de Calibración para Selenato.

Alicuota (μ l)	Aloro (ml)	Concentración (ppm)
0.5	5	0.1
1.0	5	0.2
1.5	5	0.3
2.0	5	0.4
2.5	5	0.5

Una vez preparada la curva de calibración se inyectó cada punto de la curva por triplicado.

En la Tabla 59, se observan las concentraciones a las cuales se lleva a cabo dicha curva de calibración y las áreas que se obtuvieron para cada concentración.

Tabla 59. Curva de calibración realizada para la linealidad del sistema.

Concentración	Áreas	Área/Conc
0.1	3241	324110
0.1	3335	333550
0.1	3232	323200
0.2	6554	327740
0.2	6485	324260
0.2	6535	326795
0.3	9335	311190
0.3	9416	313873.3
0.3	9845	328193.3
0.4	12733	318347.5
0.4	12384	309617.5
0.4	12851	321290
0.5	16007	320154
0.5	15835	316702
0.5	15917	318356

Para iniciar el análisis, se realizó una regresión simple del Área entre la Concentración.

Los resultados para la linealidad del sistema demuestran, el modelo lineal que describe la relación que existe entre el Área y la Concentración real. La ecuación que explica dicha relación lineal es la siguiente:

$$\text{Área} = 176.767 + 160.908 \cdot \text{Conc. Real}$$

El Gráfico 31, muestra la relación lineal que presentaron los resultados de Área contra Concentración.

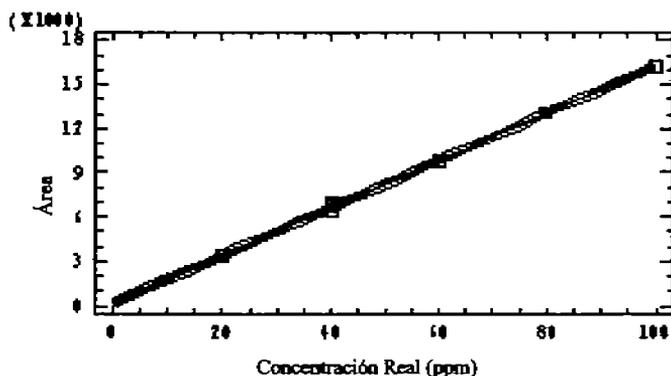


Gráfico 31. Relación lineal del Área contra la Concentración para Selenato.

Los parámetros evaluados para linealidad del sistema de Selenato son los expuestos en la Tabla 60; los cuales, indican que un coeficiente de determinación (r^2) de 99.99%, determina la linealidad del sistema y que la variabilidad en el área se debe a los cambios en la concentración; mientras, que un coeficiente de correlación igual 0.999 indican una relación relativamente fuerte entre las variables.

La estimación del error estándar es de 128.041, mostrando la desviación estándar que presentan los residuales.

Tabla 60. Parámetros de regresión simple para Selenato.

Coefficiente de Correlación	0.999
r^2	0.999
Estimación del Error Estándar	128.041

Para observar que los residuales no presentan ninguna tendencia lineal significativa, se presenta el Gráfico 32:

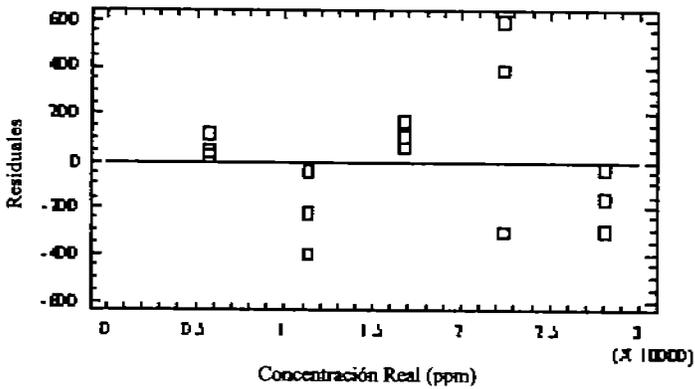


Gráfico 32. Tendencia de los residuales para Selenato

También se determinó el comportamiento que presentan los valores observados con los estimados; con el objetivo, de observar que los resultados observados siguen la misma tendencia y homogeneidad que los estimados. En el Gráfico 33, se observa este fenómeno.

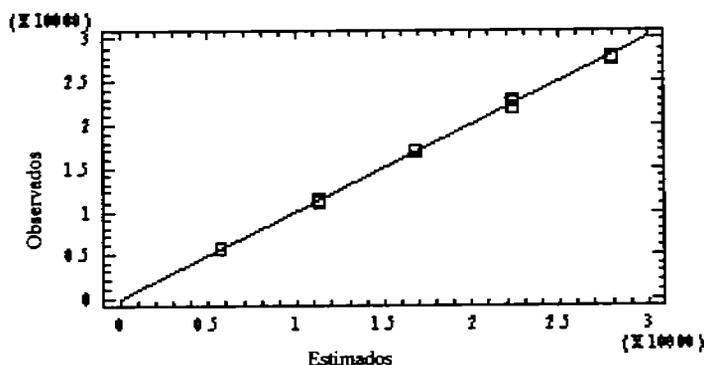


Gráfico 33. Comportamiento de los valores observados con los estimados para determinar la linealidad de Selenato.

La Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) se realiza; con el fin, de demostrar la relación que existe entre las variables estudiadas; para ello, se plantean las siguientes hipótesis:

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

H_A : Existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

El criterio de aceptación para estas hipótesis son:

Sí $F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H_0 .

Sí $F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H_0 .

En la Tabla 61, de ANOVA se observa que el F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$; por lo tanto, se acepta H_A ; entonces, sí existe una relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.

Tabla 61. ANOVA para linealidad simple de Selenato con un nivel de confianza del 95%.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.L.	Media de Cuadrados	F _{cal}	F _{critica}
Regresión	9.26563E8	1	9.26563E8	12160.22	3.35765E-20
Residuales	990551.0	13	76196.2		
Total	9.27554E8	14			

Posteriormente se evaluó para Selenato la prueba del intercepto, dada por la recta; de la cuál, se deriva las siguientes hipótesis:

H₀: Sí $b=0$ la ordenada al origen es 0

H_A: Sí $b \neq 0$ la ordenada al origen es diferente de 0

Los criterios de aceptación para dichas hipótesis son:

$t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza H₀

$t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza H₀

Análisis de regresión para el modelo lineal para el intercepto $Y = a + b \cdot X$

En la que la variable dependiente es el Área

La variable Independiente es la Concentración real.

Como se aprecia en la Tabla 62, la t_{cal} es menor a la $t_{critica}$, por lo que al considerar los criterios de aceptación de las hipótesis planteadas para el intercepto, la ordenada al origen si incluye al cero.

En cuanto a los límites presentados en la tabla de regresión del modelo lineal la mayoría de los datos se encuentran dentro de los Límites tanto Inferior como Superior.

Tabla 62. Regresión del modelo lineal para el intercepto para Selenato.

Parámetros	Estimado	Error Estándar	t _{cal}	t _{critica}	P-valor	L.I.C	L.S.C
Intercepto	172.467	167.149	1.032	2.145	0.321	31558.08	32128.09
Pendiente	277.873	2.519	110.273				

Una vez que se determinó que el modelo es lineal y que cumple con los parámetros de linealidad, se realizó un análisis de residuales.

En la Tabla 63; se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para los residuales, como el coeficiente de determinación (r^2), que posee un valor de 99.88%; el cuál, indica la linealidad del modelo y que la variabilidad en el área se debe a los cambios en la concentración; mientras, que el error estándar del estimado proporciona información acerca de la desviación estándar de los residuales con un valor de 0.005; en tanto, que el error absoluto de la Media es de 0.004, que da el valor medio de los residuales.

La prueba estadística de Durbin-Watson (DW) permite determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden de aparición de los datos. Debido a que el valor de DW es mayor de 1.4 y una probabilidad (P) mayor de 0.05, no hay una seria auto correlación que altere el orden de los residuales.

Tabla 63. Análisis de Residuales para la linealidad del Sistema de Selenato.

R-cuadrada =	99.88 Porcentaje
Error Estándar del Estimado =	0.005
Error absoluto de Media =	0.004
Estadística de Durbin- Watson =	2.343

Se plantea la siguiente hipótesis para determinar que la concentración adicionada es lineal

H₀: El sistema presenta una correlación significativa en la propiedad medida

H_A: El sistema no presenta una correlación significativa en la propiedad medida

Criterio de aceptación

$F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H₀

$F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H₀

Por lo tanto se presenta la Tabla 64, de Análisis de Varianza (ANOVA), para analizar los residuales; la cual, proporciona información acerca de que no existe una correlación estadísticamente significativa entre los residuales; debido a que la F_{cal} es mayor a la $F_{critica}$.

Tabla 64. Análisis de Varianza para los Residuales para Selenato.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Medida de cuadrados	$F_{calculada}$	$F_{critica}$
Área Real	0.299	1	0.299	11138.59	2.145
Residuales	0.0003	13	0.000026		
Total (correg)	0.3	14			

Para corroborar que el sistema no presenta una correlación significativa entre el área predicha con los residuales, a continuación se muestra el Gráfico 34, obtenida del análisis de residuales para Selenato.

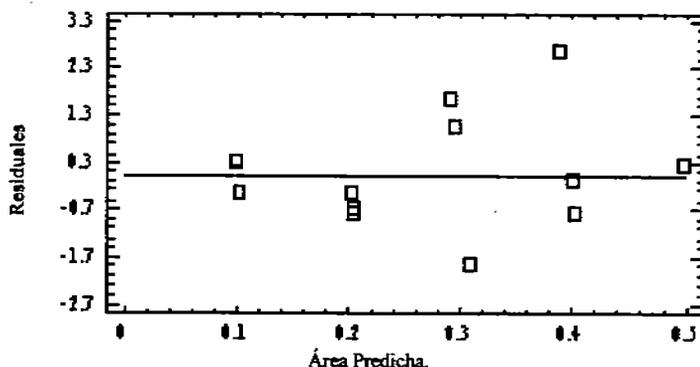


Gráfico 34. Análisis de residuales para Selenato.

Se realiza un análisis de variable múltiple que permite calcular varios datos estadísticos de interés como correlaciones, covarianzas y un parcial de correlaciones; para todos los parámetros analizados en este estudio. Derivándose el Gráfico 35 que permite observar que no hay correlaciones entre las variables analizadas; además, de que muestran una tendencia homogénea, pero no correlaciones entre sí; ya que, sus resultados no se traslapan unos con otros.

variables presentan una distribución normal; siendo el criterio de aceptación valores que se encuentren dentro de un rango de -2 a $+2$; en este caso, las variables se encuentran dentro del rango esperado.

Tabla 45. Parámetros estadísticos para el Error del Área estimada y el Error de la Concentración estimada para Selenato.

Parámetro	Error Área estimada	Error Conc. estimada
Estimado	15	15
Promedio	900.512	-0.021
Varianza	288.619	2.997
Desviación Estándar	16.989	1.731
Mínimo	873.171	-2.7
Máximo	927.466	2.81
Rango	54.296	5.51
Skewness Estándar	0.470	-0.391
Kurtosis Estándar	-0.873	-0.893

4.8.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

A continuación se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para evaluar si el área (propiedad medida), se encuentra dentro del intervalo de trabajo y si es precisa; para ello se realizó un sextuplicado de la concentración de 0.3ppm , obteniendo un coeficiente de variación de 2; por lo tanto, el sistema de Selenato es preciso.

En la siguiente Tabla 66, se encuentran los resultados estadísticos que se derivan de anterior análisis.

Tabla 66. Datos estadísticos para evaluar la precisión del sistema de Selenato.

Promedio del Área/ Conc.	6670.321
Desv. Estándar	321158.578
C.V (%)	2.077

4.8.2 LINEALIDAD DEL METODO

La linealidad del método se realizó, con 1ml de muestra (líquido ruminal) y a cada ml. de muestra; se le añadieron, respectivamente las siguientes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5ppm); aforarondose a 5ml.

Para determinar la linealidad del método de Selenato, se trabajo con concentraciones adicionadas y recuperadas; de estas se obtuvo el porcentaje de recobro, el cuál será útil para llevar este análisis. En la Tabla 67, se observan los resultados obtenidos.

Tabla 67. Linealidad del método de Selenato que muestra la Concentración Adicionada, Recuperada y % Recobro.

Sistema	Conc Adic	Conc Recup	% Recobro
1	0.126	0.139	109.573
2	0.126	0.145	114.953
3	0.126	0.144	114.161
4	0.226	0.253	111.661
5	0.226	0.263	116.122
6	0.226	0.267	117.756
7	0.326	0.393	120.343
8	0.326	0.375	114.951
9	0.326	0.399	122.181
10	0.426	0.499	117.237
11	0.426	0.501	117.425
12	0.426	0.517	121.130
13	0.526	0.622	118.085
14	0.526	0.630	119.699
15	0.526	0.617	117.382

Para la linealidad del método es importante determinar el modelo lineal, que se obtiene del análisis de regresión; el cual, explica que la variación en la Concentración Recuperada es proporcional a la Concentración Adicionada. Dicha ecuación es la siguiente:

$$\text{Conc Recup} = -0.0957829 + 1.012 \cdot \text{Conc Adic}$$

Para observar este parámetro de linealidad; se obtiene el Gráfico 37; que muestra, la tendencia lineal obtenida de la Concentración Recuperada contra la Concentración Adicionada para Selenato.

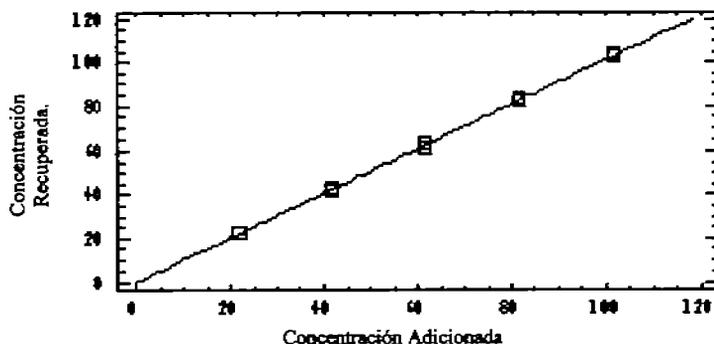


Gráfico 37. Linealidad entre la concentración recuperada y la Concentración adicionada.

Para este análisis es importante mencionar los parámetros estadísticos de regresión obtenidos para Selenato; los cuales, se muestran en la Tabla 68; arrojando, la siguiente información; un coeficiente de determinación (r^2) de 99.99% indica, que la variabilidad en la Concentración Recuperada se debe a los cambios en la Concentración Adicionada; mientras, que un coeficiente de correlación de 0.998, muestra una fuerte relación lineal entre las variables de este estudio.

La pendiente es de 1 lo que muestra que la linealidad del método es correcta y un intercepto cercano de 0.

El coeficiente de Variación es de 6.04%; siendo, mayor al 5%; por lo que, no está dentro del criterio de aceptación debido a que la degradación de los otros Seleno compuestos se convierten en Selenato.

Tabla 48. Parámetros estadísticos de regresión para Selenato.

Pendiente (m)	1.012
Intercepto (b)	-0.096
Coefficiente de Correlación (r)	0.999
Coefficiente de Determinación (r²)	0.998
C.V (%)	6.048
Intervalos de Confianza para b 95%	L.I.C, L.S.C -1.169, 1.195

A continuación se establecen las hipótesis que permiten corroborar que existe una relación lineal entre la concentración recuperada contra la concentración adicionada:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

H_A: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Criterio de aceptación

Sí $F_{cal} < F_{critica}$ No se rechaza H₀.

Sí $F_{cal} > F_{critica}$ Se rechaza H₀.

Para determinar si la linealidad del método cumple con las hipótesis antes planteadas, se realiza una Tabla de ANOVA para Selenato; la cual, arroja los siguientes resultados: una F_{cal} mayor a la $F_{critica}$; rechazándose así la hipótesis nula; por lo tanto, existe una relación lineal entre la Concentración Adicionada y la concentración Recuperada, tal como se señala en la Tabla 69.

Tabla 69. ANOVA para Selenato Recuperado.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l	Media de Cuadrados	F _{calculada}	F _{critica}
Regresión	0.436	1	0.436	7161.98	9.18738E-19
Residuales	7.9E-4	13	6E-5		
Total	0.4371	14			

Otro de los parámetros de estudio son los residuales, que permiten determinar si hay relación significativa entre los resultados; y uno de los parámetros más importante en este análisis es el valor obtenido de la estadística de Durbin-Watson (DW), el cuál debe de ser mayor de 1.4; en este caso se obtuvo un valor de DW= 2.903; lo cuál, indica que en esta prueba estadística de residuales no hay una relación significativa en el orden en el cuál aparecen los resultados. Para una mejor visualización de este fenómeno a continuación se muestra la Gráfica 38.

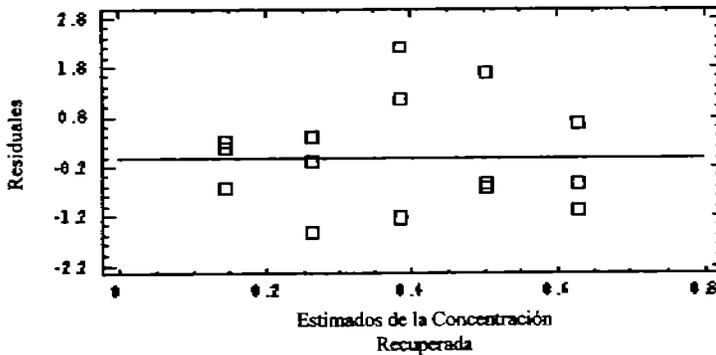


Gráfico 38. Residuales para Selenato en la linealidad del método.

El Gráfico 39, permite ver de mejor manera el comportamiento lineal y la homogeneidad que presentan los valores observados con los estimados en la linealidad del método de Selenato.

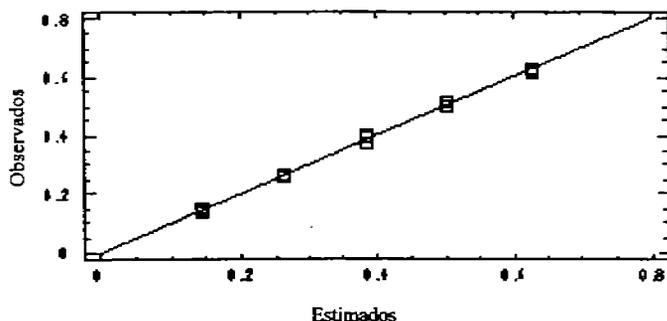


Gráfico 39. Concentración recuperada para Selenato.

También se realizó la prueba del intercepto dada por la recta y de la cuál se establecen las siguientes hipótesis:

Ho: Si $b=0$ La ordenada al origen es cero.

HA: Si $b \neq 0$ La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{critica}}$ No se rechaza Ho.

Si $t_{\text{cal}} > t_{\text{critica}}$ Se rechaza Ho.

Para esta prueba se realizó un análisis de regresión; en el que, la variable dependiente es la Concentración recuperada y la variable independiente es la Concentración adicionada; representada por este modelo lineal $Y = a + b \cdot X$.

En la Tabla 70; se muestran, los resultados obtenidos para el intercepto; en los cuales, la $t_{\text{calculada}}$ es menor que la t_{critica} ; por lo tanto, Ho no se rechaza; así que, la ordenada al origen es cero. En cuanto a la pendiente posee un valor de 1; por lo que, si cumple la linealidad del método con los parámetros establecidos.

Tabla 70. Para el intercepto en la linealidad del método de Selenato.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	t _{calculada}	t _{crítica}	P-valor
Intercepto	0.096	0.378	0.253	2.145	0.804
Pendiente	1.012	0.006	182.822		0.000

En la Tabla 71, se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para el porcentaje de recobro; de los cuales, se determinó un coeficiente de variación menor de 5%; por lo que, esta dentro del criterio de aceptación; mientras, que los resultados de porcentaje de recobro se encuentran dentro de los límites tanto superior como inferior.

Tabla 71. Parámetros estadísticos para el %Recobro de linealidad del método para Selenato.

Promedio del %Recobro	116.844
Desviación Estándar (S)	3.433
C.V (%)	2.938
Intervalo de Confianza para la Media poblacional (%)	L.I.C, L.S.C
	114.943, 118.745

4.8.3 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de la exactitud y repetibilidad, se trabajó con el porcentaje de recobro obtenido de 1 ensayo: que consta, de la adición, del estándar de Selenato a una concentración de 0.3ppm, a un ml de líquido ruminal. Este ensayo se realizó por sextuplicado; obteniendo los resultados de la Tabla 72.

Tabla 72. Resultados obtenidos de % Recobro para exactitud y repetibilidad de Selenato.

Concentración Adicionada (ppm)	% Recobro
60	102.348
60	99.969
60	102.004
60	102.098
60	102.286
60	100.031

Se realizó una prueba estadística de t a un nivel de significancia del 99.99% o una α 0.001; que permite, determinar la variabilidad existente, entre la cantidad adicionada y el porcentaje de recobro; por lo que se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: Sí el %Recobro = 100%. El porcentaje de recobro es igual al 100% para Selenato.

HA: Sí el %Recobro \neq 100% El porcentaje de recobro es diferente de 100% para Selenato.

Criterio de Aceptación

Sí $t_{cal} < t_{critica}$ No se rechaza Ho.

Sí $t_{cal} > t_{critica}$ Se rechaza Ho.

Para poder evaluar estas hipótesis se determinaron los parámetros expuestos en la Tabla 73; en los cuales se observa que la t_{cal} es menor a la $t_{critica}$; por lo que, el método es repetible aun nivel de confianza del 99.99%; además, de que los resultados de porcentaje

de recobro se encuentran dentro de los límites tanto inferior como superior; así como, también el promedio se encuentra dentro de este mismo rango.

Para determinar si es exacto se obtuvo el C.V; el cual, es de 1.118; por lo tanto, es menor a 5%; y con estos valores, se determina la exactitud y repetibilidad de este método para Selenato.

Tabla 73. Resultados obtenidos para determinar exactitud y repetibilidad para Selenato.

Promedio	101.456
Desviación Estándar (\$)	1.135
C.V (%)	1.118
t_{cal}	3.143
$t_{critica}$	6.869
Intervalos de Confianzas al 99.99%	L.I.C , L.S.C 98.274, 104.638

4.8.4 PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Para la evaluación de estos parámetros, se utilizó un análisis estadístico llamado modelo factorial jerárquico; el cual, se evaluó con los resultados obtenidos para % Recobro de Selenato, utilizándose una concentración de 0.3ppm, analizándose por dos días y dos analistas diferentes. Obteniendo los resultados de la Tabla 74.

Tabla 74. Resultados obtenidos de %Recuperado para determinar Precisión y reproducibilidad para Selenato.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	0.3067	0.3105
	0.3057	0.3247
	0.3138	0.3289
Día 2	0.3167	0.3119
	0.3198	0.3187
	0.3085	0.3284

Para este análisis también se establecen hipótesis; las cuales, permiten determinar si existen diferencias entre los porcentajes de recobro de Selenato obtenidos entre analistas y los días analizados.

Dichas hipótesis son:

Ho: No existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

HA: Existe efecto del analista y el día en el porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación

Sí $F_{cal} < F_{tab}$ No se rechaza Ho.

Sí $F_{cal} > F_{tab}$ Se rechaza Ho.

Para determinar que criterio de aceptación cumple este análisis, se realizó un Análisis de Varianza, con los resultados obtenidos de porcentaje de recobro; ya antes, presentados en la Tabla 74. Dicho Análisis de Varianza se muestra en la Tabla 75; en el que, se determina, que la F_{cal} es menor a la F_{tab} ; por lo que, no se rechaza Ho; esto significa que el método es reproducible ya que con los porcentajes de recobro obtenidos no hay efecto de los analistas ni en el día de análisis.

Tabla 75. Análisis de Varianza del porcentaje de Recobro de Selenato.

Fuente	g.l	S.C	C.M	F_{cal}	F_{tab}
Analista	1	2.2E-4	2.2E-4	7.027	18.513
Día	2	6.375E-05	3.1875E-05	0.592	4.459
Error	8	4.3E-4	5.3833E-05		
Total	11				

La exactitud se determina de forma simultánea con los porcentajes de recobro obtenidos anteriormente; de los cuales, se obtienen los parámetros estadísticos mostrados en la Tabla 76; los cuales, indican que el Coeficiente de Variación obtenido es de 2.55; el cuál, es menor de 5%; por lo que, el método es si es exacto para Selenato.

Tabla 76. Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método para Selenato.

Promedio	0.316
Desviación Estándar	0.008
C.V (%)	2.556

Para representar de mejor forma el efecto que tuvo el día y analista en este estudio se muestra el Gráfico 40; en el que se puede analizar que no existe diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos para el efecto día ya que se observa un traslape en los resultados obtenidos de porcentajes de recobro para el día 1 y 2; por lo tanto, no existe efecto del día en el análisis.

En cuanto al analista se observa que a pesar de que se obtienen porcentajes de recobro un poco más elevados para el analista 2 si existe una zona de traslapamiento de resultados entre analistas por lo que el efecto analista tampoco influye en este análisis.

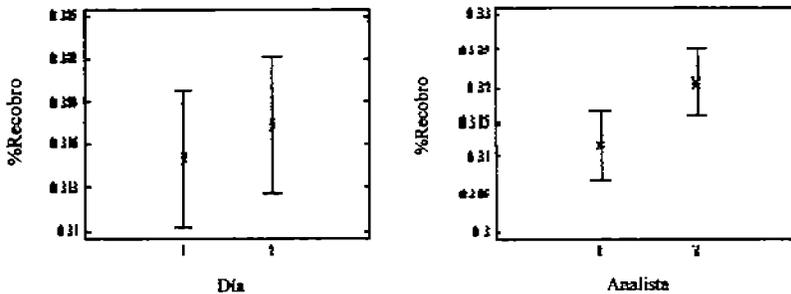


Gráfico 40. Comparación de resultados obtenidos de día y analista para Selenato con Intervalo de Confianza del 95%.

Otros parámetros de la validación que se determinaron, es el Límite de Detección y Cuantificación; los cuales, se determinaron bajando la concentración de los estándares y con ayuda del equipo; ya que, este proporciona el valor de 3 y 6 veces la desviación estándar.

Obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 77:

Tabla 77. Resultados obtenidos de Límite de Cuantificación y Límite de Detección

	Límite de Cuantificación	Límite de Detección
Seleno Cistina	2.5ppm	1.25ppm
Seleno Metionina	7.5ppm	5ppm
SeO ₃	2.5ppm	1.25ppm
SeO ₄	0.0008ppm	0.0002ppm

4.9 Cuantificación de Seleno compuestos en Líquido ruminal.

Posteriormente se procede a la cuantificación de Seleno Cistina, Seleno Metionina y SeO_4 en la muestra de Líquido ruminal. A continuación en la Tabla 78 se presentan los resultados obtenidos de dicha cuantificación.

Tabla 78. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Líquido ruminal de rumiantes sin tratamiento con bolos de Selenio.

Derivado del Selenio	Concentración (ppm)
Seleno Cistina	5.074
Seleno Metionina	4.518
SeO_4	8.648×10^{-3}

4.10 Cuantificación de Seleno compuestos en Masa Bacteriana Ruminal.

En la Tabla 79 se presentan los resultados obtenidos para cuantificar los Seleno compuestos presentes en la muestra Masa Bacteriana ruminal.

Tabla 79. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Masa Bacteriana de rumiantes sin tratamiento con bolos de selenio.

Derivados de Selenio	Concentración (ppm)
Seleno Cistina	0.539
Seleno Metionina	0.200
SeO_4	7.988×10^{-3}

Como se observa en la Tabla 78 y 79 para la cuantificación de Seleno compuestos; en la masa bacteriana ruminal; se observan, menores concentraciones de Seleno Cistina y Seleno Metionina y una mayor concentración de SeO_4 ; que en, las muestra de Líquido ruminal; lo cuál, se puede deber a que las bacterias presentes en dicha muestra estén degradando el selenio orgánico en inorgánico.

4.11 Cuantificación de Seleno compuestos en Líquido ruminal para muestras obtenidas del tratamiento con bolo de Selenio.

Como se observa en las Tablas 80 y 81 para la cuantificación de Seleno compuestos; en la Masa Bacteriana ruminal se observan menores concentraciones de Seleno Cistina y Seleno Metionina y concentraciones mayores de SeO_4 que los obtenidos para Líquido ruminal; lo que, se puede deber a que las bacterias presentes en dicha muestra estén degradando el selenio orgánico en inorgánico; lo cuál, quiere decir que están utilizando el selenio para su consumo.

Se cuantificaron los Seleno-compuestos, del Líquido ruminal; de muestras obtenidas, de animales sometidos a una dieta rica en Selenio; por medio, de la administración de bolos de Selenio, obteniéndose los resultados de la Tabla 80.

Tabla 80. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de Líquido ruminal de rumiantes tratados con bolos de Selenio.

Derivados de Selenio	Concentración (ppm)
Seleno Cistina	6.409
Seleno Metionina	2.636
SeO_4	8.136×10^{-3}

4.12 Cuantificación de Seleno compuestos en Masa Bacteriana ruminal para muestras obtenidas del tratamiento con bolo de Selenio.

Al cuantificar los Seleno-compuestos de la Masa Bacteriana ruminal; de muestras obtenidas, después del tratamiento con bolos de Selenio en los animales, se determinaron los resultados de la Tabla 81:

Tabla 81. Cuantificación de Seleno compuestos en muestras de masa bacteriana de rumiantes tratados con bolos de Selenio.

Derivados de Selenio	Concentración (ppm)
Seleno Cistina	0.377
Seleno Metionina	0.139
SeO_4	8.087×10^{-4}

5.-CONCLUSIONES

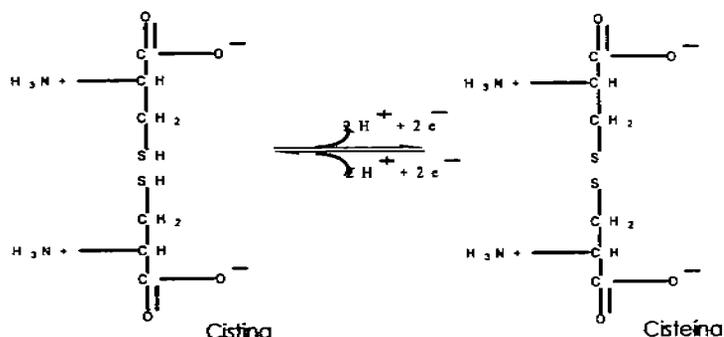
- ❖ La técnica de Electroforesis Capilar permite la separación de los Seleno compuestos de forma rápida y con un bajo costo.
- ❖ Se establecieron los pretratamientos adecuados para cuantificar los Seleno compuestos en muestras biológicas (Líquido ruminal y Masa Bacteriana ruminal).
- ❖ Además, se determinaron los parámetros de validación del método y sistema con muestras de Líquido ruminal; determinándose así, que este método cumple de manera satisfactoria con todos los parámetros de validación establecidos en la guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos; para cada uno de los analitos estudiados en este trabajo; por lo cual, es un método confiable y exacto, que se puede utilizar para otras aplicaciones.

6.-PERSPECTIVAS

Se debe de obtener seleno-cisteína a partir de seleno-cistina a fin de contar con otro seleno-compuesto que puede ser de interés en las muestras biológicas y ver si bajo las condiciones de análisis se separa de los otros seleno aminoácidos.

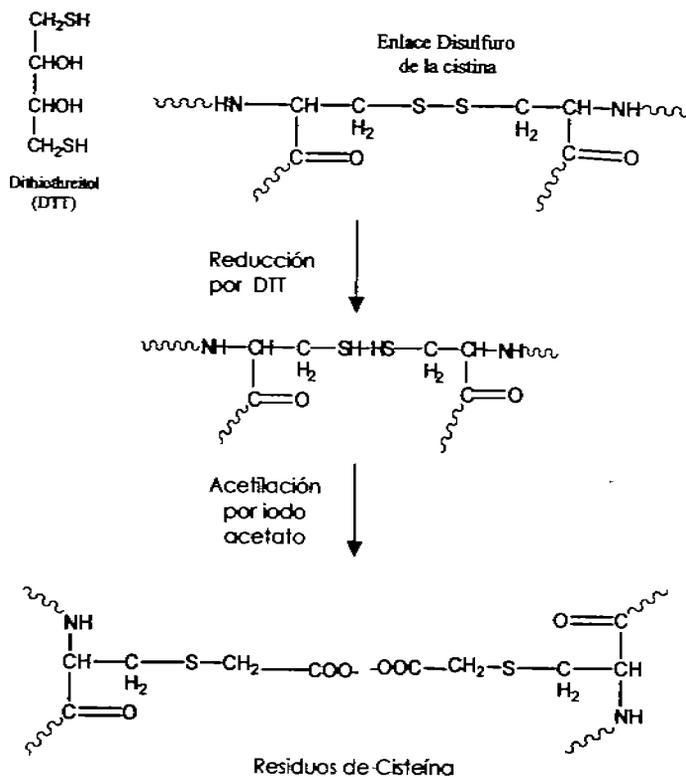
Obtención de la seleno-cisteína.

Al realizar una revisión bibliográfica se encontró que la cisteína se oxida fácilmente para formar un enlace covalente de un aminoácido dimérico llamado cistina; en el cual dos moléculas de cisteína son unidas por un puente disulfuro. Los residuos de este enlace disulfuro son fuertemente hidrofóbicos o no polares. Por lo tanto dos moléculas de seleno cisteína forman la molécula de seleno cistina como se muestra en las siguientes estructuras.



Según la bibliografía la ruptura del puente disulfuro se debe realizar con el reactivo Dithiothreitol (DTT) el cual logra la reducción de cistina, y después de la reducción debe realizarse una acetilación con iodo acetato a fin de que no permita la reformación de puentes disulfuro.

La siguiente reacción muestra esta obtención.



Otra forma es suspender a la Seleno-cisteína en 50mM Tris (hidroximetil) amino metano (Tris*HCl) buffer, a pH 8.0 y probando diferentes cantidades de DTT. Estas solo son algunas sugerencias que se presentan en este trabajo para la ruptura del enlace disulfuro, las cuales pueden ser útiles para posteriores trabajos.^{17,9,19}

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Adriana Olivera Cabrera, 2004, "Caracterización y Cuantificación de compuestos de Selenio en una levadura enriquecida por Electroforesis Capilar". Tesis de Licenciatura FES Cuautitlán. UNAM, Cuautitlán Izcañi, Edo. Méx.
2. Amit Chatterjee, Hiroaki Tao, Yusuyuki Shibata, Masatoshi Morita, "Determination of Selenium Compounds in urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 997 (2003) 249-257.
3. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., "Guía de Validación de Métodos Analíticos".
4. Edward Stevens and Ian D. Hume, "Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients", Vol. 78. American Physiological Society, (393-420).
5. Foret Frantisek, Bocek T. Kriváncova L., "Capillary Zone electrophoresis", 1993, Ed. VCH, Alemania.
6. Heiger N. David, (1997), "High performance Capillary Electrophoresis", Hewlett Packard Company, 3a. ed. Francia.
7. Institute of Food and Agricultural Sciences, "Minerales para ruminantes en Pastoreo en Regiones Tropicales", University of Florida, Mc. Agrico. 32-42.
8. J. Zheng, H. Greschonig, F. Liu y W. Kosmus. Trace elements and Electrolytes 17 (2000) 40-47.
9. J.N. Bumell, J.A. Karle, and A. Shrift, "Reduction of DL- Selenocystine and Isolation of L- Selenocysteine", *Journal of Inorganic Biochemistry* 12, 343-351 (1980).
10. Krystyna Pyrzyńska Talantla 55 (2001) 657-667.
11. Landers, James P. "Handbook of Capillary Electrophoresis" CRC press, USA, 1993.
12. Miriam Aide Castillo Rodríguez, "Desarrollo de un Programa en ambiente Multimedia sobre electroforesis Capilar, Tesis de Licenciatura FES Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcañi, Edo. De Méx., 2001.
13. Ph. D.D.C. Church, "Fisiología Digestiva y Nutrición de los Ruminantes", Vol. 1, 1ed., Ed. Acribia, Zaragoza (España), 175-189.
14. Robinson J.F., Rubinson K.A., 2000, "Química Analítica Contemporánea" . Ed. Pearson Education, México.

15. Serra, K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara, "Inorganic Selenium for Sheep, Its Influence on rumen Bacterial Yield, Volatile Fatty Acid Production and Total Tract Digestion of Timothy Hay", Faculty of Agriculture, Shimane University, Matsue 690, Japan 1994, Vol. 7 (91-96).
16. Skoog Douglas, James J. L., 1994 "Análisis Instrumental", 4a. Ed., Mc. Graw Hill, España.
17. W. Rodwell, Darty K. Granner, Robert K. Murray, Peter A. Mayes, "Bioquímica de Harper", Ed. Manual Moderno, 12 ed., 291.
18. Winefordner J.D., Khaledi M., "Chemical Analysis High-Performance Capillary Electrophoresis" Wiley-InterInterscience, USA.
19. David L. Nelson, Michael M. Cox, "Lehninger Principles of Biochemistry" , 3 ed., Ed Wort Publishers, New York, 2003, 142-143,120.