



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Caracterización y clasificación composicional de piensos para
gallinas ponedoras por técnicas quimiométricas**

Autor: Beatriz Sanz López

Tutor/es: M^a del Sol Vega Alegre (UVa) / Raquel Pereira Martín (LABDIAL)

RESUMEN

La avicultura dedicada a la cría y explotación de gallinas ponedoras es un sector económico relevante en Castilla y León. Para que las explotaciones sean rentables, debe garantizarse el correcto estado nutricional y la salud de las aves, y la dieta debe proporcionar la cantidad de nutrientes necesarios para su crecimiento, mantenimiento y producción de huevos en la vida adulta. Los piensos compuestos se diseñan específicamente para satisfacer esas necesidades nutricionales cambiantes. Simultáneamente, la dieta debe estar exenta de sustancias tóxicas que podrían suponer un riesgo para la salud, tanto de los animales como de los consumidores.

En este trabajo se han analizado 48 muestras de piensos comercializados en España por varios fabricantes, y destinados a las diferentes etapas de crecimiento de las aves ponedoras. Se han investigado macronutrientes como proteína (método Kjeldahl), grasa (método Soxhlet) y contenido mineral total (cenizas por gravimetría), micronutrientes (Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Na, Mg, Mn, P, Se y Zn) y elementos tóxicos (As, Cd, Pb, Sn). Los contenidos de metales se han determinado por ICP-OES e ICP-MS. Los resultados experimentales se han analizado mediante herramientas estadísticas univariantes y multivariantes para encontrar relaciones y asociaciones entre los macronutrientes, y similitudes y diferencias entre los productos comercializados por distintos fabricantes.

La aplicación de técnicas estadísticas univariantes (gráficos *box plot*, ANOVA y test no paramétrico de Kruskal-Wallis) a los resultados experimentales ha demostrado que las diferencias observadas entre los niveles de macronutrientes en los piensos están relacionadas con el tipo de pienso (con independencia del productor), es decir, dependen únicamente de la etapa de cría a la que van dirigidos. Por el contrario, los niveles de algunos micronutrientes y de elementos tóxicos no guardan relación con el tipo de pienso pero varían significativamente entre fabricantes.

El análisis multivariante (análisis clúster y análisis en componentes principales) ha permitido agrupar, por un lado, variables correlacionadas y, por otro, muestras con composición similar. Estos agrupamientos han permitido relacionar diferentes fabricantes y tipos de pienso con variables químicas concretas. Así, el factor fabricante se ha podido relacionar de nuevo con el diferente contenido de algunos elementos traza, que probablemente provienen de las materias primas y, en menor medida, del proceso de fabricación. Por el contrario, la concentración de macronutrientes está asociada exclusivamente al tipo de pienso. Estas herramientas quimiométricas ayudan por tanto a la clasificación de productos alimentarios a partir del perfil composicional.

ABSTRACT

The aviculture which is dedicated to raising laying hens is a relevant economic sector in Castilla y León. In order for the farms to be profitable, the correct nutritional status and health of the hens must be guaranteed, and the diet must provide the amount of nutrients they need for their growth, maintenance and for the production of eggs in adult life. The feeds are designed to specifically meet those changing nutritional needs. Simultaneously, the diet should not contain toxic substances, as they could pose a risk to the health of animals and consumers.

In this project, we have analyzed 48 samples of feed marketed in Spain, by a variety of manufacturers, and intended for the different stages of growth of laying hens. We have investigated macronutrients as protein (Kjeldahl method), fat (Soxhlet method), total mineral content (ash by gravimetry), micronutrients (Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Na, Mg, Mn, P, Se y Zn) and toxic elements (As, Cd, Pb, Sn) by ICP-OES and ICP-MS.

The experimental results have been analyzed using univariate and multivariate statistical tools to find relationships and associations among the macronutrients, and similarities and differences among the products marketed by different manufacturers.

The univariate analysis of the results (box plot, ANOVA and Kruskal-Wallis nonparametric test) has shown that the type of feed factor predominates over the manufacturer factor to explain the variability in the elemental and nutritional composition of the samples investigated. By contrast, the levels of some micronutrients and toxic elements are not related to the type of feed but vary significantly among manufacturers.

The multivariate analysis (cluster analysis and principal component analysis) has allowed the grouping of correlated variables and samples with similar composition. These groupings have allowed to relate different manufacturers and types of feed with specific chemical variables.

Thus, it is shown again that the concentration of essential nutrients is associated exclusively with the type of feed, while the manufacturer is related to the different content of trace and toxic elements. These probably come from raw materials and, to a lesser extent, from the manufacturing processes, always obtaining values lower than the maximum permitted limits, so that the safety of these feeds with respect to their content in toxic metals is guaranteed.

Therefore, these chemometric tools help to the classification of food products and manufacturers from the compositional profile.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	7
3.2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	8
3.2.1. Determinación del contenido de proteína total	8
3.2.2. Determinación del contenido de cenizas totales	9
3.2.3. Determinación del contenido de grasa bruta	10
3.2.4. Mineralización de las muestras por vía húmeda	10
3.2.5. Determinación de elementos mayoritarios por ICP-OES	11
3.2.6. Determinación de elementos traza por ICP-MS	12
3.3. ANÁLISIS DE DATOS	13
3.3.1. ANOVA	13
3.3.2. Box-plot	14
3.3.3. Análisis multivariante	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES	17
4.2. RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS	21
4.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE	23
4.3.1. Análisis Clúster	23
4.3.2. Análisis de componentes principales	25
5. CONCLUSIONES	29
6. REFERENCIAS	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La nutrición de las aves ponedoras

Los alimentos, además de nutritivos, deben ser seguros y de origen conocido, manteniendo estos atributos a lo largo de la cadena de producción, desde el origen hasta el consumidor. En este contexto, las fábricas de pienso para animales de granja deben satisfacer estos requisitos y superar los retos con los que se enfrentan como actividad económica en un mundo competitivo y globalizado, sin perder de vista el bienestar animal, la seguridad alimentaria y la rentabilidad de la producción ganadera.

La etiqueta de un pienso es su tarjeta de presentación, requisito imprescindible y una de las formas que el ganadero tiene para comparar los diferentes piensos que se le ofertan y de informarse de sus características nutricionales.

La valoración de la composición química de un alimento, en especial de sus macrocomponentes, es esencial como primera tarea para conocer su valor nutritivo. El etiquetado nutricional tiene como fin que el consumidor conozca las cualidades alimenticias del producto, es decir, qué nutrientes tiene (proteínas, hidratos de carbono, oligoelementos, etc.) y en qué cantidad [1].

El pienso es un alimento animal, constituido por una mezcla de materias primas (vegetales, animales y/o minerales) que son transformadas o no con el fin de lograr un alimento nutritivo y sano para los animales.

En el caso de la ganadería avícola, se deben desarrollar dietas específicas que proporcionen la cantidad necesaria de nutrientes disponibles para la cría, el mantenimiento, la producción y la reproducción de los animales. Un programa nutricional óptimo para aves ponedoras debe garantizar la ingesta adecuada de aminoácidos (esenciales y no esenciales), carbohidratos, ácidos grasos, minerales y vitaminas. Por una parte, interesa que el periodo improductivo de la recría sea corto y las pollitas comiencen a producir cuanto antes. Por otra parte, no interesa que los huevos producidos sean pequeños ya que son difíciles de comercializar. Debido a que los huevos puestos por las pollitas demasiado jóvenes son pequeños, se procura retrasar su madurez sexual hasta al menos las 20 semanas de edad, siendo la restricción alimentaria un método eficaz usado por los granjeros con este fin [2, 3].

Las pollitas se alimentan con varios tipos de pienso según la explotación: un pienso de iniciación hasta las 6-8 semanas, un pienso de crecimiento hasta las 16 semanas, y un pienso de prepuesta a partir de las 16 semanas. La concentración energética de los

piensos de recría es baja para evitar engrasamientos. En el pienso de prepuesta se aumenta el contenido en calcio hasta un 2.0-2.5% para favorecer la formación de suficientes reservas óseas, de manera que durante el posterior periodo de puesta no aparezcan fenómenos de debilidad de huesos o de la cáscara del huevo. La cáscara del huevo contiene un 95% de carbonato cálcico, equivalente a casi 2.5 g de calcio elemental por cáscara, por lo que el aporte de calcio es fundamental para la correcta formación del huevo. Además del calcio, otros nutrientes que intervienen en la calidad de la cáscara son el manganeso, que participa en la trama proteica de la cáscara, y la vitamina D3 que participa en la absorción y movilización del calcio [4].

La deficiencia de calcio provoca también osteoporosis en aves adultas, deformaciones óseas, raquitismo y disminución del crecimiento en los individuos más jóvenes. El calcio y el fósforo se encuentran en estrecha dependencia con la vitamina D.

Los minerales comprenden la fracción inorgánica del pienso y están incluidos en las cenizas obtenidas por combustión. Se presentan en forma de sales tanto orgánicas como inorgánicas y representan una fracción que va desde el 1,5 al 5% de la composición química de los piensos. Los animales los utilizan básicamente como componentes principales de los tejidos de sostén (huesos) y como electrolitos del metabolismo celular.

La conducción y transmisión neural y muscular son altamente dependientes de los niveles adecuados de sodio, potasio y magnesio, que se absorben en el tracto intestinal de las aves. Son importantes en el mantenimiento de la presión osmótica, regulación del equilibrio ácido-base y control del metabolismo del agua en los tejidos [5].

Los piensos también pueden contener trazas de elementos tóxicos. La contaminación por metales pesados y metaloides en recursos hídricos, suelos y aire comprometen la seguridad alimentaria y la salud pública. La exposición prolongada a trazas de ciertos elementos tóxicos como mercurio, arsénico, cadmio o plomo provoca bioacumulación en los tejidos animales con el consiguiente riesgo para la salud de los propios animales y del consumidor final. Dependiendo del tipo de metal o metaloide, se producen afecciones que van desde daños en órganos vitales hasta desarrollo de tumores cancerígenos.

El límite máximo de algunos elementos traza tóxicos en piensos compuestos está regulado por la Directiva 2002/32/CE [6] sobre sustancias indeseables en la alimentación animal (Tabla 1.1):

Elemento	Contenido máximo (ppm) en piensos compuestos calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 %
As	2
Cd	0,5
Hg	0,1
Pb	5

Tabla 1.1. Límites máximos de consumo de metales

Las proteínas forman partes importantes de los tejidos blandos de las aves tales como músculos, tejido conectivo, colágeno, piel, plumas, yema, etc. En realidad, las necesidades de los animales se establecen en función de aminoácidos, más que en valores de proteína bruta. Las dietas de los animales han de tener en cuenta los requerimientos de aminoácidos esenciales y no esenciales, que dependen de la especie, la edad, el sexo, la salud, el estado productivo, el medio en el que viven y el destino comercial, los cuales deben ser satisfechos en forma equilibrada para lograr una buena salud y una mayor productividad.

El déficit de proteína en la dieta de aves ponedoras genera un desequilibrio nutritivo que induce a una disminución del consumo de ración y una bajada en la producción, caída de puesta, deficiencia en el emplumado (aminoácidos azufrados) y reducción del tamaño del huevo. El exceso de proteína en la dieta, por su parte, se almacena en forma de grasa y puede llevar al aumento de la mortalidad y a una disminución del consumo de pienso.

Los lípidos son la fuente más concentrada de energía. La mayor parte se encuentra en forma de triglicéridos. Los lípidos del pienso proporcionan energía, ácidos grasos esenciales y pigmentos. Los animales son capaces de sintetizar ácidos grasos saturados, pero no los ácidos linoleico y α -linolénico, considerados esenciales. El exceso de lípidos e hidratos de carbono puede provocar alteraciones metabólicas caracterizadas por un exceso de ingesta de energía, con la imagen clínica de obesidad. En condiciones normales el ave es capaz de regular su ingesta, pero si el pienso es muy rico en energía pueden superarse esas necesidades [4].

1.2. Métodos de análisis para la caracterización composicional de piensos.

Los laboratorios de control de calidad de las empresas fabricantes de piensos para pollos emplean métodos oficiales bien establecidos para la determinación de los diferentes parámetros químicos de interés.

Para llevar a cabo el análisis de proteína total en el pienso pueden usarse dos métodos diferentes: el método Kjeldahl y el método Dumas. En el método Kjeldahl se digieren las proteínas y otros compuestos orgánicos de los alimentos con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores, convirtiendo el nitrógeno orgánico total en ion amonio. La mezcla resultante se alcaliniza con una base fuerte y se destila, recogiendo el amoníaco destilado en una solución de ácido bórico. Los iones borato formados se valoran con ácido clorhídrico estandarizado para determinar el nitrógeno contenido en la muestra. En el método Dumas la muestra se combustiona a una temperatura alta en una atmósfera de oxígeno y en presencia de un catalizador para formar óxidos. Los óxidos de nitrógeno (NO_x) resultantes se separan de otros productos de la combustión (agua y CO_2), se

reducen a nitrógeno elemental con la ayuda de cobre metálico y se analizan con un detector de conductividad térmica.

Los resultados obtenidos por ambos métodos se indican en forma de porcentaje o en mg de nitrógeno, que se puede convertir en contenido proteico mediante el uso de factores de conversión, que varían dependiendo del producto analizado y que se han establecido a partir del patrón de aminoácidos de los diferentes alimentos. Para las muestras de pienso y alimentos con una composición variable, se ha establecido un factor de conversión general de 6,25 [7].

Ni el método Dumas ni el Kjeldahl son selectivos a la proteína. El método Dumas determina el nitrógeno total, incluidas las fracciones inorgánicas como el nitrito y el nitrato, mientras que el método Kjeldahl determina únicamente el nitrógeno orgánico y el amonio. La diferencia metodológica provoca a menudo resultados discrepantes entre ambos procedimientos. Además, la recuperación de algunos compuestos nitrogenados heterocíclicos tiende a ser incompleta en el método Kjeldahl. Aunque los factores de conversión deberían tener en cuenta también esta diferencia metodológica, suelen usarse los mismos factores para convertir los valores Dumas y Kjeldahl en proteína bruta. Con el fin de evitar malentendidos, es importante indicar claramente el método que se ha utilizado para las determinaciones de la proteína cruda. Para evitar conflictos comerciales, la Comisión Europea confirmó el método Kjeldahl como el método comunitario para los controles oficiales (Reglamento (CE) N.º 152/2009) [8].

El contenido en grasa bruta se analiza mediante el método Soxhlet, basado en la extracción selectiva de la grasa con un disolvente apolar (habitualmente éter de petróleo), seguida por la destilación del disolvente y posterior determinación gravimétrica de la grasa extraída.

El contenido total de minerales en el pienso se determina gravimétricamente calcinando la muestra a una temperatura que permita la combustión de la fracción orgánica (550 °C). Las cenizas resultantes de este análisis pueden disolverse en medio ácido para determinar en la disolución los elementos presentes individualmente. Alternativamente, la muestra puede someterse a una digestión ácida oxidante, habitualmente con ácido nítrico, asistida por microondas para reducir el tiempo de preparación de muestra. La disolución ácida resultante de ambos métodos de mineralización se analiza para determinar los contenidos de los elementos de interés. Los elementos mayoritarios suelen cuantificarse por espectroscopía atómica de llama (AAS y AES) o por espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), mientras que los elementos traza se analizan por espectroscopía atómica con cámara de grafito (ET-AAS) o por ICP-MS [9].

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las necesidades nutricionales de las aves ponedoras varían según la etapa de crecimiento en la que se encuentren, y los piensos empleados en su alimentación deben satisfacer esas necesidades cambiantes.

El mercado de piensos para aves ponedoras ofrece productos nutricionalmente diferentes, orientados a las sucesivas fases del crecimiento. Además, la variabilidad de las materias primas y de los procesos de fabricación empleados por las diferentes empresas del sector hace que la composición química de los piensos comercializados para aves ponedoras sea muy heterogénea.

El trabajo realizado tiene dos objetivos principales:

(1) Caracterizar, desde el punto de vista de su composición nutricional y del contenido de elementos esenciales y tóxicos, piensos compuestos destinados a las diferentes etapas de la cría de aves ponedoras.

(2) Investigar si las concentraciones de nutrientes (proteína, grasa y contenido mineral total) y de diversos elementos metálicos esenciales y tóxicos, presentes en los piensos, dependen únicamente del tipo de pienso o si además se observan diferencias significativas entre los fabricantes, e intentar encontrar una herramienta quimiométrica que permita clasificar los piensos en base a su composición.

Para ello se han determinado los contenidos de proteína total (método Kjeldahl), grasa total (método Soxhlet), fracción mineral total como ceniza (gravimetría), elementos mayoritarios (ICP-OES) y elementos traza (ICP-MS) en muestras de piensos, suministrados por diferentes fabricantes y destinados a las diferentes etapas de la cría de gallinas ponedoras.

Los resultados analíticos obtenidos se interpretarán mediante herramientas estadísticas univariantes (diagramas de cajas y bigotes (*box plots*), análisis de varianza (ANOVA)) para visualizar y estimar el efecto de los factores fabricante y tipo de pienso en las variables químicas analizadas. El empleo de técnicas estadísticas multivariantes (análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados jerárquicos (AC)) permitirá encontrar diferencias y similitudes en la composición química de los diferentes piensos analizados, así como correlaciones entre variables que de otra forma pasarían inadvertidas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de pienso analizadas pertenecen a una empresa privada llamada LABDIAL. Su trabajo está enfocado en la prestación de servicios, tanto analíticos como técnicos, en el campo de la producción primaria y en la industria alimentaria.

LABDIAL pertenece al grupo empresarial multinacional EW GROUP, con sede en Alemania, cuya actividad está enfocada a la genética de aves. Las actividades principales de la compañía son la genética, la nutrición y la sanidad animal.

LABDIAL se creó en 2007, heredando personal y conocimientos de Ibertec S.A.U., una empresa de reconocido prestigio en el sector de la avicultura de España, independizando de esta manera la actividad de servicios analíticos y asesoramiento técnico para ofrecer un servicio objetivo al sector de la avicultura y de la industria alimentaria.

LABDIAL es un laboratorio ubicado en el Parque Tecnológico de Boecillo, y se encuentra certificado bajo las Normas ISO 9001 e ISO 14001 desde el año 2004. En el año 2010 consiguió su primera acreditación bajo la Norma ISO 17025, en ensayos de productos agroalimentarios.

LABDIAL recibe y analiza, de tres fabricantes denominados A, B y C, los tipos de pienso que se detallan en la Tabla 3.1:

TIPO		FASE DEL AVE
1	RLX	Puesta inicial
2	RLO	Puesta intermedia
3	RLA	Puesta final
4	C1	Recría hasta 4 semanas
5	C2	Recría hasta 10 semanas
6	C3	Recría hasta traslado a puesta
7	KA	Recría hasta 8 semanas
8	F1	Puesta hasta 26 semanas
9	F3	Puesta hasta 34 semanas

Tabla 3.1. Nomenclatura de los diferentes tipos de pienso analizados

En este trabajo se muestran los resultados analíticos de 48 muestras de piensos para gallinas ponedoras recibidas en LABDIAL entre septiembre de 2017 y abril de 2018. Una vez etiquetadas, las muestras se trituraron y homogenizaron en un molino, y se guardaron hasta su análisis en envases estériles de polietileno de alta densidad con tapón de rosca, en un lugar seco.

3.2 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Todas las determinaciones se han realizado por duplicado (salvo que se especifique lo contrario) siguiendo los protocolos IT-PR de LABDIAL.

3.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL

La proteína total se ha determinado a partir del contenido de nitrógeno Kjeldahl, cuyo análisis implica tres etapas sucesivas: digestión, destilación y valoración.

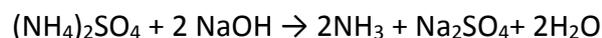
Se pesa, con precisión de ± 0.1 mg, 1 g de muestra sobre papel de fumar sin nitrógeno y se introduce en un tubo del digestor con papel incluido. Se añade a cada tubo 2 pastillas kjeltabs y 15 ml de ácido sulfúrico 98%. Paralelamente a las muestras, se procesa de la misma forma una muestra control (0,2 g de triptófano) y un blanco de muestra.

Se coloca el colector de humos sobre los tubos y se introducen en el digestor (Fig. 3.1) a 420°C durante 1 hora o hasta digestión completa. La digestión provoca la transformación del nitrógeno proteico en ion amonio mediante calentamiento a una temperatura de 420°C , con adición previa de ácido sulfúrico y catalizador (pastillas kjeltabs, que contienen 3.5 g K_2SO_4 y 0.4 g CuSO_4). La reacción que tiene lugar en esta etapa es la siguiente:

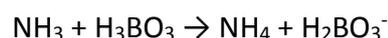


Los humos liberados se aspiran a través del depurador (Fig. 3.1), que consta de dos jarras. La primera contiene hidróxido sódico al 10% e indicador azul de bromotimol para neutralizar los gases ácidos (principalmente SO_2 y SO_3) liberados durante la digestión. Los gases no neutralizados son finalmente lavados en la segunda jarra que contiene agua destilada. Una vez finalizada la digestión, se retiran los tubos del digestor y se dejan enfriar en el soporte.

Para destilar el amonio formado en la digestión, se coloca el tubo de la muestra en el destilador (Fig.3.1), se adiciona NaOH y se calienta, produciéndose la reacción ácido-base:



Se genera NH_3 y vapor de agua que arrastra al NH_3 hasta un Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 30 ml de ácido bórico 4% (solución ácida), en el que se produce la neutralización del amoníaco destilado y se forma una cantidad equivalente de borato:



El borato se valora finalmente con HCl 0.1 N previamente normalizado, empleando un valorador automático:

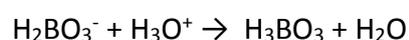




Fig.3.1. Componentes del equipo Kjeldahl, de izquierda a derecha: digestor, depurador y destilador.

El contenido de proteína (en %) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ proteína} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot N \cdot PM_N \cdot F}{m_1} \cdot 100$$

donde N es la normalidad del ácido clorhídrico utilizado en la valoración, F es un factor de conversión que depende de la matriz (F = 6,25 para piensos), m_1 es la masa de la muestra en mg, V_1 es el volumen (ml) de HCl gastado en la muestra o patrón y V_0 es el volumen (ml) de HCl gastado con el blanco.

3.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS TOTALES

El porcentaje de cenizas de una muestra está correlacionado con el contenido total de minerales. El método de determinación se basa en la eliminación de la materia orgánica presente en la muestra por calcinación y la determinación gravimétrica del residuo mineral.

Antes de pesar los crisoles, se desecan calcinándolos en el horno de mufla a 550 °C durante 2 h. Se dejan enfriar en un desecador durante 1 h y se pesan. A continuación, se pesan con precisión 5 g de muestra en cada crisol, se desecan a 100 °C en la mufla durante 2 h y a continuación se calcinan a 550 °C durante 5 h. Finalizada la calcinación de la materia orgánica, los crisoles se dejan enfriar en el desecador durante 1 h y se pesan.

El contenido de cenizas totales (en %) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100$$

donde m_1 es la masa del crisol vacío, m_2 es la masa del crisol con la muestra y m_3 es la masa del crisol con el residuo.

3.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA BRUTA

Se ha determinado el contenido total de grasa mediante el método Soxhlet en un equipo Soxtec 2058 (Foss) (Fig. 3.2).

Se pesa 1 g de Celite® sobre una hidrocápsula previamente tarada (Fig.3.2), y sobre éste 2 g de muestra, pesados con precisión de ± 0.1 mg. Se homogeneiza la mezcla de muestra y Celite® con una varilla de vidrio. Se limpia la varilla de vidrio con un pequeño trozo de algodón y éste se introduce dentro de la hidrocápsula.

Se añaden perlas de cristal a los vasos metálicos (Fig.3.2) que contendrán el extractante para evitar salpicaduras durante la ebullición, y se desecan en la estufa a 103°C. Transcurrida una hora se enfrían en el desecador, se pesan y se añade a cada vaso 80 ml de éter de petróleo. Se colocan las hidrocápsulas con la muestra en los adaptadores y se conectan a los imanes del Soxtec. Tras someter la muestra a la extracción Soxhlet durante 90 min, se retiran los vasos metálicos con la grasa extraída en su interior, se llevan a la estufa a 103°C durante 1 hora para eliminar el éter residual, se enfrían en el desecador y se pesan.

El contenido de grasa total (en %) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{grasa} = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \cdot 100$$

donde m_1 es la masa de muestra analizada, m_2 es la masa del vaso de extracción vacío y m_3 es la masa del vaso de extracción con la grasa extraída.



Fig.3.2. Componentes del equipo Soxtec. De izquierda a derecha: extractor Soxtec 2058, hidrocápsula y vaso metálico.

3.2.4. MINERALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS POR VÍA HÚMEDA

Para determinar los contenidos de metales mayoritarios y elementos traza se han sometido las muestras de pienso a una digestión ácida asistida por microondas. En vasos de PTFE aptos para el horno de microondas (MILESTONE ETHOS PLUS) se pesan 0.2 g de pienso con precisión de ± 0.1 mg y se añaden 7 mL de HNO₃ (65%, Scharlau). Una vez encamisados los vasos de reacción, se cierran herméticamente, y se colocan en el rotor del horno. El vaso de control, en el que se introduce una de las muestras, lleva una sonda de temperatura que

permite el control de la potencia de microondas para mantener la temperatura de digestión en los valores deseados. El programa de digestión se inicia irradiando la cavidad del horno con microondas de forma que la temperatura aumenta a velocidad constante hasta alcanzar 185 ± 2 °C, lo que se consigue en 20 min. A continuación, se mantiene la temperatura constante a ese valor durante 20 min adicionales. Una vez finalizada la digestión se deja que las muestras se enfríen a una temperatura inferior a 50°C, lo que se consigue al cabo de aproximadamente 1 h. Después, se abren los reactores en la vitrina de humos y se trasvasa cuantitativamente el contenido a matraces aforados de 50 mL, enrasando finalmente con agua desionizada. Posteriormente, las disoluciones obtenidas se guardan refrigeradas en botes de policarbonato (Deltalab) hasta el momento de su análisis.

Se determinaron los metales totales en los extractos, por ICP-OES e ICP-MS, utilizando los equipos ubicados en Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVa). Los elementos totales determinados han sido expresados en mg/kg o g/kg, dependiendo del nivel de concentración.

3.2.5. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS MAYORITARIOS POR ICP-OES

Los elementos mayoritarios han sido analizados en un ICP-OES Agilent 725-ES que se esquematiza en la Figura 3.3.

El equipo se calibró con patrones multielementales preparados por dilución de un multipatrón comercial de 1000 mg/L (ICP-multielement calibration standard solution, Scharlau). El flujo de plasma utilizado fue 15.0 L Ar/min y de 1.50 L Ar/min como gas auxiliar. La presión del nebulizador fue 200 kPa y el tiempo de lavado 10 s. Las lecturas fueron tomadas como promedio de 3 medidas replicadas. La Tabla 3.2. recoge los elementos analizados y las longitudes de onda empleadas para la cuantificación:

Elemento	λ (nm)	Elemento	λ (nm)
Na	588.995	Fe	238.204
K	766.491	Mn	257.610
Ca	317.933	Al	396.152
Mg	285.213	Zn	213.857
P	213.618		

Tabla 3.2. Longitudes de onda de los elementos analizados por ICP-OES

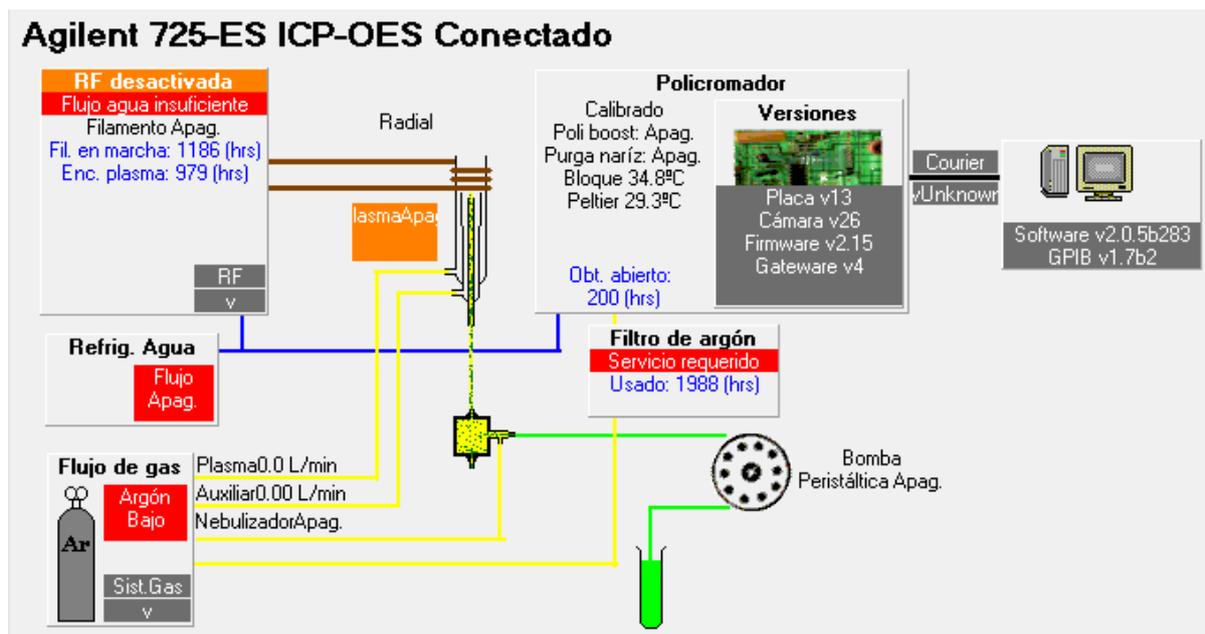


Fig. 3.3. Esquema del equipo ICP-OES

3.2.6. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA POR ICP-MS

Los elementos traza se determinaron por ICP-MS en un equipo Agilent 7500c (Fig. 3.4) equipado con un detector de masas cuadrupolo y con celda de colisión. Al igual que en el ICP-OES, el equipo fue calibrado con patrones preparados por dilución de un multipatrón comercial. El flujo del gas portador fue de 1.05 L Ar/min y de 0.15 L Ar/min para el gas auxiliar. La bomba del nebulizador tiene una velocidad de 0.15 rps y en la celda de colisión el flujo de gas es de 3.5 mL He/min.

En la Tabla 3.3. se muestran los valores de las relaciones m/z de las especies determinadas mediante esta técnica.

Elemento	m/z	Elemento	m/z
Al	27	As	75
Mn	55	Se	82
Fe	56	Cd	111
Co	59	Sn	118
Cu	63	Pb	208
Zn	66		

Tabla 3.3. Relación m/z de los elementos analizados

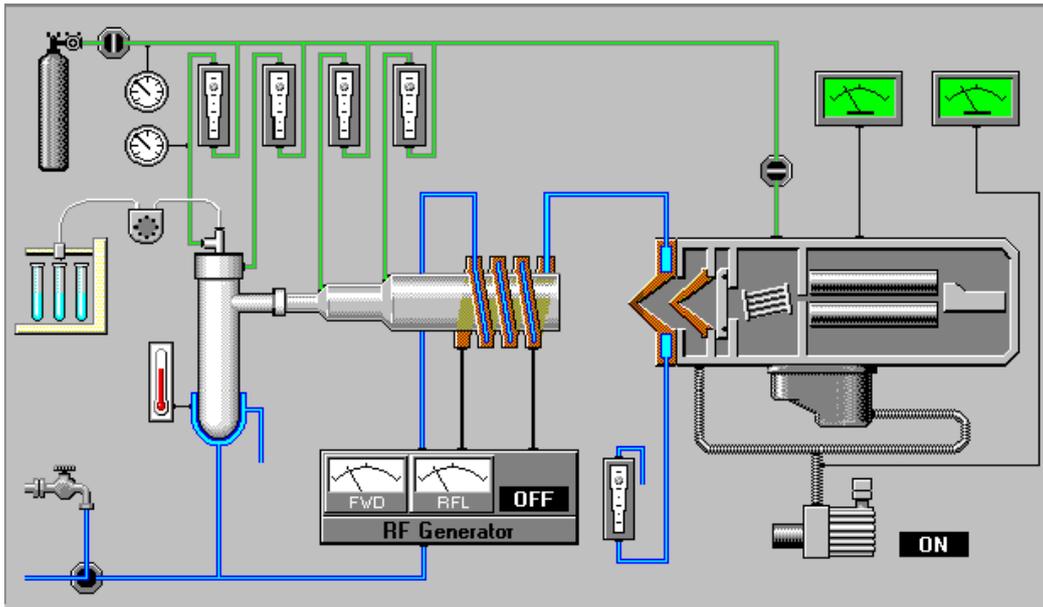


Fig. 3.4. Esquema del equipo de ICP-MS

3.3. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis e interpretación de los datos obtenidos se han usado herramientas estadísticas univariantes y multivariantes, de uso indispensable para la interpretación y visualización de datos analíticos, donde existe una gran variedad y cantidad de datos que deben ser relacionados.

Además de los análisis univariantes habituales, se han aplicado herramientas de análisis multivariante, las cuales permiten encontrar relaciones entre los parámetros estudiados y las muestras analizadas. Los cálculos y análisis estadísticos necesarios en este trabajo se han llevado a cabo con el software Microsoft Excel 2016 y los paquetes estadísticos Statgraphics XVII, IBM SPSS Statistics 23 y Minitab 17.

3.3.1. ANOVA

El análisis de varianza es una técnica estadística para la interpretación de resultados experimentales que examina diferentes tipos de efectos (generalmente llamados fuentes de variación) que operan simultáneamente, para decidir qué tipo de efectos son significativos y estimar su contribución a la varianza total, asumiendo que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Esta herramienta estadística usa pruebas basadas en ratios de varianza para determinar si existen diferencias significativas entre varios grupos de observaciones, donde cada grupo sigue una distribución normal. Se asume que la variación observada es debida al efecto de los factores estudiados, aunque también está presente

cierto error aleatorio independiente que explica la variación residual. Dicho error aleatorio sigue una distribución normal con media 0 y varianza constante.

Para aplicar el ANOVA es necesario que la variable siga una distribución normal y que las varianzas sean homogéneas dentro de los diferentes niveles de cada factor considerado.

Si los resultados de una variable siguen una distribución normal (prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov) y sus varianzas son homogéneas es posible realizar un ANOVA. En aquellas variables que no sigan una distribución normal o presenten heterocedasticidad, no es recomendable aplicar la prueba de ANOVA, por lo que habría que aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis [10-12].

3.3.2. BOX-PLOT

Los gráficos *box-plot* o diagramas de caja (también denominados gráficos de caja y bigote) facilitan la visualización de la distribución de los valores que toma una variable dada: intervalo de valores de la variable, dispersión, simetría o asimetría de la distribución o presencia de valores extremos. La línea central de la caja representa la mediana, mientras que la parte inferior y la parte superior de la caja muestran las ubicaciones del primer y tercer cuartil (Q1 y Q3). Los bigotes son las líneas que se extienden desde la parte inferior y superior de la caja hasta las observaciones más bajas y más altas dentro de la región delimitada por $Q1-1.5(Q3-Q1)$ y $Q3+1.5(Q3-Q1)$. Los puntos individuales con valores fuera de estos límites representan valores atípicos (*outliers*) [10-12].

3.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Las herramientas de análisis multivariante, entre las que se encuentra el Análisis de Componentes Principales (ACP) y el Análisis de Conglomerados Jerárquicos o Análisis Clúster (AC), facilitan la visualización e interpretación de grandes volúmenes de datos, ya que por lo general reducen la dimensionalidad de la matriz de datos, encontrando relaciones entre los parámetros estudiados y/o las muestras analizadas. El objetivo es conocer la existencia de clases o agrupaciones en un conjunto de objetos relacionados entre sí de alguna manera, y de los que se conoce una serie de propiedades o variables.

ACP y AC son métodos de clasificación no paramétricos (no usan medias ni varianzas en los cálculos), por lo que son bastante insensibles a la falta de normalidad de las variables. En muchas ocasiones, las variables que se determinan son de naturaleza muy diferente, lo cual implica diferencias en el tipo de escala, así como en el orden de magnitud de los elementos correspondientes. En ese caso se pueden producir efectos no deseados, ya que las variables

de mayor magnitud tendrán un peso superior, y en muchos casos injustificado, en el resultado final.

Por ello, es conveniente escalar o normalizar las variables para compensar esos efectos antes de llevar a cabo los análisis. En este trabajo, la normalización se realizó transformando los valores de cada variable en el correspondiente valor z.

Análisis Clúster (AC)

El análisis clúster es un método que permite clasificar las muestras en categorías o clústeres en base a sus similitudes composicionales. Se calcula una matriz de medidas de similitud o distancia entre objetos (muestras) de forma que los objetos más similares se unen para producir un grupo. Los grupos próximos se van uniendo en sucesivas etapas hasta obtener un único conglomerado. La sucesión de conglomerados se visualiza en un dendrograma [12].

Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de componentes principales se emplea para identificar asociaciones o patrones de comportamiento de muestras y variables en matrices de grandes dimensiones (n variables x m objetos). Para ello se transforman las variables experimentales, normalmente correlacionadas y que contienen todas ellas el mismo porcentaje de varianza, en un número igual de variables no correlacionadas (ortogonales), llamadas componentes principales, PC, que son combinaciones lineales de las variables originales.

El primer PC (PC1) explica la máxima cantidad de varianza de la tabla de datos original y se correlaciona con muchas variables. El segundo PC (PC2) explica varianza no incluida en PC1, y está correlacionado con variables que no muestran una correlación fuerte con el primer PC, y así sucesivamente hasta obtener todos los PCs. De esta forma la información (varianza) se concentra en los primeros PC y únicamente aquellos componentes que explican más varianza que una variable original son retenidos para visualización e interpretación, reduciendo así la dimensionalidad de la matriz de datos.

Los cálculos matemáticos necesarios incluyen la diagonalización de la matriz de covarianza (que coincide con la matriz de correlación cuando se normalizan las variables). La correlación entre los PCs y las variables originales se expresan mediante las cargas (loadings) y las medidas transformadas de las muestras, referidas a los nuevos componentes o ejes, se llaman puntuaciones (scores). Los valores propios o eigenvalues de los nuevos PCs son una medida de la varianza asociada, esto es, de la información de la tabla original explicada por cada PC. Las variables o muestras con valores similares en la tabla original de datos tendrán cargas similares o puntuaciones en el nuevo PC.

Por tanto, una representación conjunta de los PCs más significativos (que explican más varianza) revelará asociaciones o correlaciones entre muestras y/o variables que de otra forma pasarían desapercibidas por la simple observación de la tabla original [10-13].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

Con el fin de resumir el gran volumen de información recogida durante la fase experimental, se han determinado algunos parámetros estadísticos básicos, los cuales se recogen en la Tabla 4.1.

Variable	Unidades	Media	Mediana	Desv. estándar	Curtosis	Coef. de asimetría	Mín.	Máx.
Proteína	%	16,63	16,55	1,41	0,13	0,55	14,22	20,25
Grasa	%	5,77	5,73	1,00	0,32	0,49	3,75	8,55
Cenizas	%	9,78	11,41	3,28	-1,71	-0,28	4,61	14,54
Ca	%	2,69	3,41	1,43	-1,76	-0,28	0,73	4,78
K	%	0,73	0,71	0,08	-0,82	0,21	0,57	0,90
Mg	%	0,20	0,20	0,05	5,83	2,23	0,14	0,39
Na	%	0,15	0,15	0,03	0,02	0,65	0,11	0,23
P	%	0,59	0,59	0,08	-0,21	0,39	0,45	0,81
Al	mg/kg	291,10	241,64	156,27	-0,02	1,06	84,23	648,31
Fe	mg/kg	281,57	236,79	95,94	-0,95	0,69	155,44	485,89
Zn	mg/kg	96,76	92,52	19,45	0,05	0,74	67,81	152,69
Mn	mg/kg	123,55	115,67	34,04	-0,30	0,71	71,17	200,90
Co	mg/kg	0,38	0,33	0,17	-0,68	0,61	0,12	0,77
Cu	mg/kg	22,40	20,28	14,71	28,87	4,96	9,92	110,89
As	mg/kg	0,18	0,14	0,12	4,41	2,10	0,05	0,62
Se	mg/kg	0,75	0,72	0,33	-0,15	0,23	0,12	1,54
Cd	mg/kg	0,09	0,09	0,05	2,96	1,06	0,00	0,29
Sn	mg/kg	0,06	0,05	0,08	2,35	1,00	-0,07	0,35
Pb	mg/kg	0,34	0,29	0,20	0,98	0,95	0,06	0,95

Tabla 4.1. Estadísticos descriptivos de las variables estudiadas en las 48 muestras de pienso.

Algunas de las variables presentan diferencias significativas entre la media y la mediana, sugiriendo una distribución asimétrica de los resultados. Los elevados valores de los coeficientes de curtosis y asimetría obtenidos para algunas variables también sugieren la falta de normalidad en sus distribuciones.

Los gráficos box-plot de los elementos analizados permiten visualizar la variabilidad de nutrientes y elementos traza tóxicos en los diferentes tipos de pienso y/o en los diferentes fabricantes.

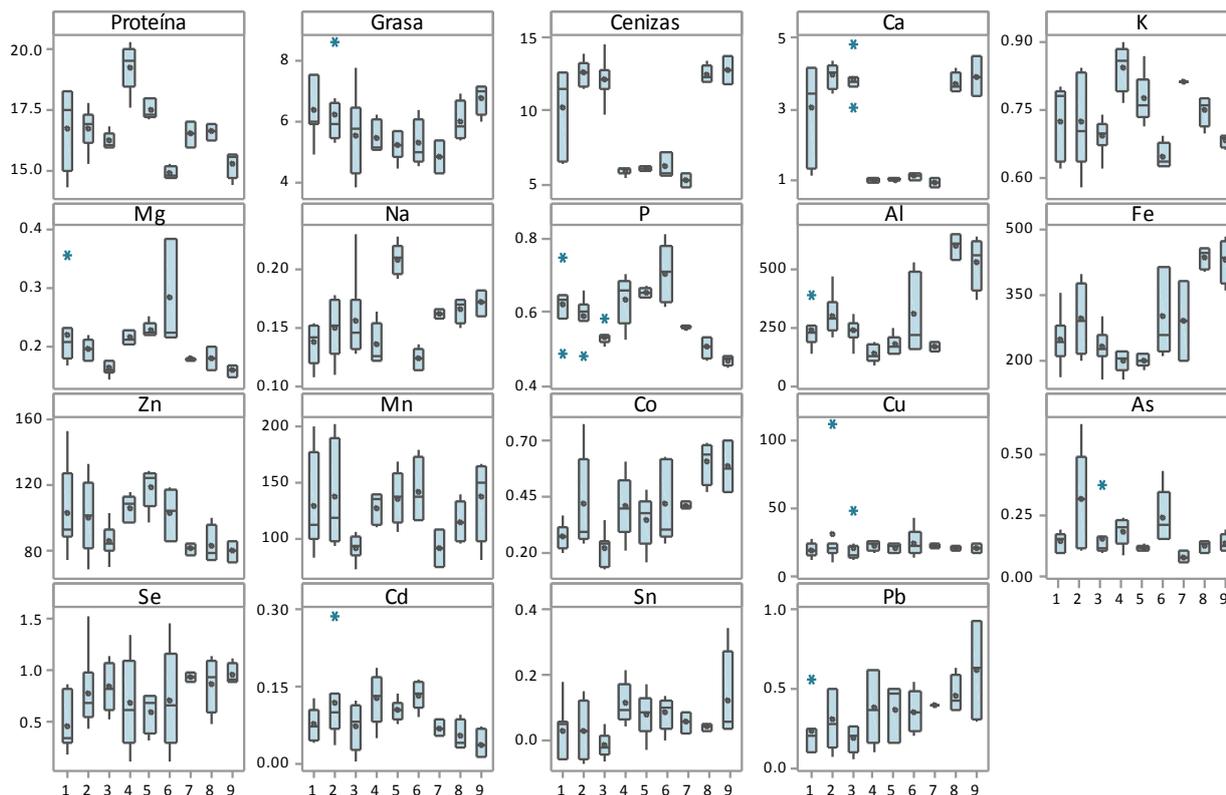


Fig. 4.1. Box-plots según el tipo de pienso. Códigos de piensos en Tabla 3.1.

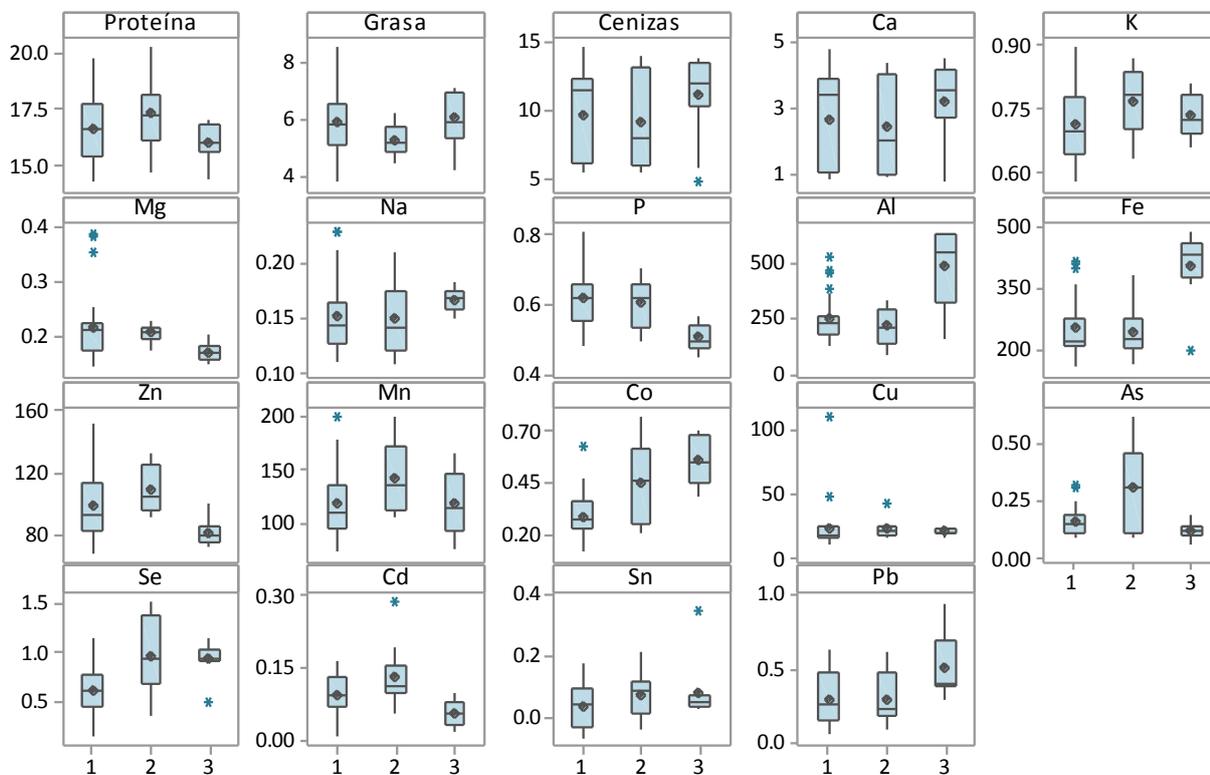


Fig. 4.2. Box-plots según el fabricante: (1) A, (2) B y (3) C.

En estos diagramas pueden observarse las diferencias significativas entre los piensos, que ocurre cuando las cajas no se solapan entre ellas.

Se observa que las diferencias composicionales son más acusadas entre tipos de pienso que entre fabricantes. Por ejemplo, en la proteína se observa que el máximo valor se encuentra en la caja 4 (C1), que es pienso para aves recién nacidas, las cuales necesitan este nutriente para crecer. En la grasa las diferencias son menos acusadas pero, a medida que el ave crece, el contenido en grasa también aumenta. El diagrama de las cenizas y del Ca es el más significativo de todos, donde la diferencia entre los tipos de pienso es muy notable, ya que las crías casi no necesitan estos nutrientes, pero las ponedoras necesitan mucha más cantidad para la adecuada formación de la cáscara de los huevos. Por otro lado, el diagrama que menos información aporta es el del Cu, donde todos los valores son similares.

El contenido de elementos traza no parece tener una clara relación con el tipo de pienso analizado pues se observa una gran variabilidad dentro de todos los tipos de pienso, sin patrones interpretables a simple vista. También se observa que los valores de los elementos tóxicos no superan los límites máximos permitidos por la legislación (As: $0,18 < 2$ mg/kg; Cd: $0,09 < 0,5$ mg/kg; Pb: $0,34 < 5$ mg/kg) [6].

En el gráfico de distribución de valores por fabricante se observa la enorme similitud entre la composición media de los piensos de los fabricantes 1 (A) y 2 (B), mientras que los productos del fabricante 3 (C) muestran valores más significativos de algunos elementos traza (Fe, Al, Co o Pb). Por el contrario, los productos del fabricante 2 (B) muestran contenidos algo superiores de As, Se y Mn.

Pero debido a que algunas herramientas estadísticas para el análisis de datos están condicionadas por la forma de la distribución que toman los valores de las distintas variables, se ha procedido a aplicar un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (K-S), empleando como hipótesis de contraste (H_0) que los datos siguen una distribución normal. La hipótesis sólo se mantendrá si la probabilidad calculada es superior al nivel de significación empleado, esto es $p > 0.05$.

Para comprobar si los factores *fabricante* y *tipo de pienso* tienen un efecto significativo en las variaciones observadas entre las muestras, se han utilizado dos herramientas estadísticas: ANOVA (análisis de varianza) y prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis (K-W).

Para aplicar el ANOVA es necesario que la variable siga una distribución normal y que las varianzas sean homogéneas dentro de los diferentes niveles de cada factor considerado. Este requisito no es necesario en la prueba K-W, pues emplea estadísticos no paramétricos (medianas y rangos) en lugar de medias y varianzas. Ambas herramientas estadísticas persiguen determinar si las diferencias entre los valores de la variable en las muestras son aleatorias o, por el contrario, existe una fuente de variación responsable de las diferencias observadas.

Para determinar si es posible aplicar ANOVA es necesario realizar la prueba de homogeneidad de varianzas. Se aceptará que las varianzas son similares (H_0) solo cuando la probabilidad calculada por el test sea $p > 0.05$.

Si los resultados de una variable siguen una distribución normal (prueba de normalidad de K-S) y sus varianzas son homogéneas, es posible realizar un ANOVA. En aquellas variables que no siguen una distribución normal o cuyas varianzas no son homogéneas es recomendable aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Al igual que en el ANOVA, si el valor de probabilidad obtenido al estudiar el efecto de un factor es $p > 0.05$, se concluirá que el factor no afecta a los resultados; por el contrario, si $p < 0.05$, se evidencia que el factor fabricante y/o tipo de pienso tiene efecto significativo sobre los resultados.

En la Tabla 4.2 se recogen los resultados de ANOVA y de la prueba K-W. Se han resaltado en negrita aquellos parámetros con $p < 0.05$ que indican que se debe rechazar la hipótesis nula (H_0) y por tanto que el efecto es significativo.

Variables	Factor tipo de pienso				Factor fabricante		
	Normal. (K-S)	Homog. Var	ANOVA	Kruskal-Wallis	Homog. Var	ANOVA	Kruskal-Wallis
Proteína	0,200	0,000	0,000	0,000	0,162	0,233	0,229
Grasa	0,017	0,400	0,069	0,031	0,328	0,043	0,051
Cenizas	0,000	0,000	0,000	0,000	0,199	0,386	0,450
Ca	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,524	0,814
K	0,200	0,000	0,001	0,003	0,560	0,286	0,255
Mg	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,091	0,009
Na	0,200	0,097	0,000	0,001	0,034	0,366	0,090
P	0,200	0,043	0,000	0,000	0,253	0,001	0,001
Al	0,000	0,001	0,000	0,000	0,022	0,000	0,011
Fe	0,000	0,000	0,000	0,001	0,876	0,000	0,002
Zn	0,059	0,043	0,013	0,011	0,021	0,008	0,003
Mn	0,007	0,003	0,086	0,034	0,995	0,186	0,126
Co	0,031	0,001	0,001	0,003	0,001	0,000	0,000
Cu	0,000	0,117	0,947	0,677	0,311	0,964	0,494
As	0,000	0,003	0,010	0,049	0,000	0,001	0,067
Se	0,200	0,294	0,255	0,107	0,018	0,002	0,003
Cd	0,200	0,365	0,022	0,014	0,197	0,004	0,007
Sn	0,200	0,069	0,067	0,036	0,858	0,421	0,446
Pb	0,090	0,001	0,018	0,086	0,498	0,018	0,050

Tabla 4.2. Valores p a posteriori de las pruebas estadísticas aplicadas.

Como puede observarse, muchas variables se distribuyen asimétricamente. En el análisis de la influencia del factor tipo de pienso, las varianzas son en general heterogéneas, los datos son heterocedásticos y este factor tiene efecto significativo sobre los resultados en la

mayoría de variables. Sin embargo, el factor fabricante tiene menos contribución en la variabilidad de los resultados, sobre todo en los nutrientes esenciales. De los resultados obtenidos se concluye que el factor responsable de la variabilidad observada en la mayoría de los parámetros analizados es el factor tipo de pienso, mientras que la variabilidad debida al fabricante no es significativa, excepto en los elementos traza que, como ya se ha comentado con anterioridad, presentan variaciones significativas entre fabricantes que pudieran estar relacionadas con la composición de las materias primas, o por el propio proceso de fabricación.

4.2. RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS

El coeficiente de correlación bivariada de Pearson, r , es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables cuantitativas relacionadas linealmente. Éstos pueden ser tanto positivos como negativos, de tal manera que su valor oscila entre 0 y ± 1 [10-12].

Los coeficientes de correlación de Pearson se muestran en la Tabla 4.3. en la que los valores sombreados de rojo indican correlaciones significativas positivas y los resultados resaltados en azul muestran correlaciones significativas negativas. Son correlaciones significativas aquellas con un coeficiente de correlación superior al valor crítico ($r_{\text{critico}}=0,2845$ para $n=48$, $gdl=46$ y un nivel de significación $\alpha=0,05$).

Se observa que prácticamente todos los metales tienen correlaciones positivas entre sí a excepción de Al-Zn que presentan una correlación negativa.

Las cenizas muestran una correlación fuertemente positiva con el calcio, como era de esperar, ya que el pienso avícola tiene una gran cantidad de carbonato cálcico (CaCO_3) que es la principal fuente de calcio en aves ponedoras, a fin de aumentar el tiempo de retención en la molleja y mejorar la calidad de la cáscara. Debido a su origen, el CaCO_3 contiene cantidades variables de minerales, tales como Fe, el cual muestra también una correlación positiva con las cenizas [3]. El resto de metales están correlacionados negativamente tanto con las cenizas como con el calcio.

Los elementos Na y K están débilmente correlacionados entre sí y muy poco con el resto de variables analizadas. Por el contrario, Al y Fe tienen una fuerte correlación entre sí, así como con Ca y algunos elementos traza, pero negativa con el P.

Cabe destacar la correlación entre P y Cd, que pudiera estar relacionada con el empleo de fertilizantes fosfatados en agricultura. Se han reportado elevados niveles de cadmio en este tipo de fertilizantes, y se ha demostrado que su uso continuado produce la acumulación de Cd en suelos y plantas, desde donde podría incorporarse a los piensos a través de los cereales empleados en su fabricación [14, 15].

	Proteína	Grasa	Cenizas	Ca	K	Mg	Na	P	Al	Fe	Zn	Mn	Co	Cu	As	Se	Cd	Sn
Proteína																		
Grasa	-0,029																	
Cenizas	-0,132	0,371																
Ca	-0,132	0,359	0,990															
K	0,825	-0,177	-0,139	-0,158														
Mg	-0,154	-0,062	-0,493	-0,547	-0,146													
Na	0,187	-0,269	0,101	0,072	0,344	-0,270												
P	0,151	-0,255	-0,552	-0,562	0,126	0,603	-0,016											
Al	-0,416	0,362	0,509	0,447	-0,271	0,082	0,021	-0,406										
Fe	-0,385	0,332	0,388	0,325	-0,212	0,149	0,071	-0,308	0,898									
Zn	0,111	-0,223	-0,444	-0,447	0,095	0,387	0,144	0,569	-0,315	-0,178								
Mn	-0,062	0,115	-0,188	-0,221	-0,026	0,481	-0,010	0,315	0,145	0,335	0,662							
Co	0,004	0,095	0,094	0,056	0,265	-0,074	0,107	-0,153	0,410	0,461	0,151	0,437						
Cu	-0,029	0,356	-0,039	-0,032	-0,206	0,045	-0,166	0,062	0,028	0,089	0,135	0,316	0,062					
As	-0,016	-0,005	0,163	0,132	0,054	0,163	-0,117	0,209	0,040	0,148	0,424	0,522	0,349	0,244				
Se	-0,049	0,071	0,265	0,250	0,119	-0,355	0,101	-0,384	0,161	0,212	-0,167	-0,025	0,492	-0,034	0,246			
Cd	0,164	-0,392	-0,277	-0,314	0,190	0,371	0,051	0,621	-0,278	-0,182	0,594	0,385	0,153	0,003	0,644	-0,026		
Sn	0,022	-0,137	-0,354	-0,342	0,098	0,214	-0,056	0,065	0,093	0,184	0,271	0,411	0,225	0,045	0,033	-0,030	0,039	
Pb	-0,056	0,199	-0,099	-0,138	0,065	-0,006	0,073	-0,119	0,311	0,339	-0,017	0,121	0,515	0,044	0,046	0,114	0,091	0,243

Tabla 4.3. Coeficientes de correlación bivariable de Pearson

4.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

4.3.1. ANÁLISIS CLUSTER

El Análisis Clúster permite clasificar las muestras en categorías o clústeres en base a sus similitudes composicionales. El Análisis Clúster jerárquico realizado en este trabajo se ha llevado a cabo mediante el método de Ward como método de conglomeración y la distancia euclídea al cuadrado como medida de similitud o distancia, junto con valores previamente normalizados.

Los dendrogramas obtenidos, representados en la Fig. 4.3, muestran las variables y las muestras analizadas agrupadas en función de su similitud. Los dendrogramas han sido complementados con herramientas de visualización (mosaico de colores) para facilitar la interpretación de las relaciones entre muestras y variables. En el mosaico de color, los tonos azul intenso indican valores mínimos de concentración, que van variando hacia tonos amarillos y rojos a medida que aumenta la concentración del parámetro.

El dendrograma de las variables (ubicado en la parte superior de la figura), contiene tres conglomerados principales (CV1, CV2 y CV3) de los parámetros analizados en los piensos. En CV3 están relacionados Cd-As, Mn-Zn y P-Mg, bastante separados del resto de variables. En CV2 están fuertemente relacionados Fe-Al, Ca-cenizas y K-proteína, tal y como predecía el coeficiente de correlación bivariada de Pearson. Mientras que en CV1 se agrupan, aunque de forma menos intensa, las variables Sn, Se y Na; Co-Pb están algo más relacionadas, y por último, K-proteína fuertemente relacionados.

En el dendrograma de las muestras (ubicado a la derecha de la figura), se han coloreado las muestras en función del tipo de pienso y su fabricante. En él, se observa que hay 2 agrupamientos principales, los cuales contienen varios subgrupos (CM1, CM2, CM3 y CM4). El agrupamiento de la izquierda contiene la mayoría de piensos para aves adultas (ponedoras) mientras que el agrupamiento de la derecha contiene los piensos de las aves de recría. Analizando esto junto con el mosaico de color se observa que CM1 y CM2 tienen abundancia en calcio y cenizas, ya que son ponedoras y necesitan estos nutrientes para las cáscaras de los huevos, pero CM3 y CM4 son deficientes en ellos. Sin embargo, con la proteína ocurre lo contrario. Se observan colores cálidos para CM3 y CM4, y fríos para CM1 y CM2, ya que las crías necesitan más proteína para crecer. A medida que el pienso es destinado a aves de mayor edad, va disminuyendo progresivamente su concentración en proteína (de amarillo a azul oscuro).

Las muestras agrupadas en CM1 son ricas en grasa, mientras que el grupo CM2 es rico en los nutrientes de CV2, destacando Fe y Al. CM3 tiene abundancia de los metales agrupados en CV3. Los piensos del fabricante C tienen el mayor contenido de Co. En general, los piensos comercializados por fabricantes diferentes para la misma etapa de crecimiento aparecen agrupados a corta distancia, salvo alguna excepción.

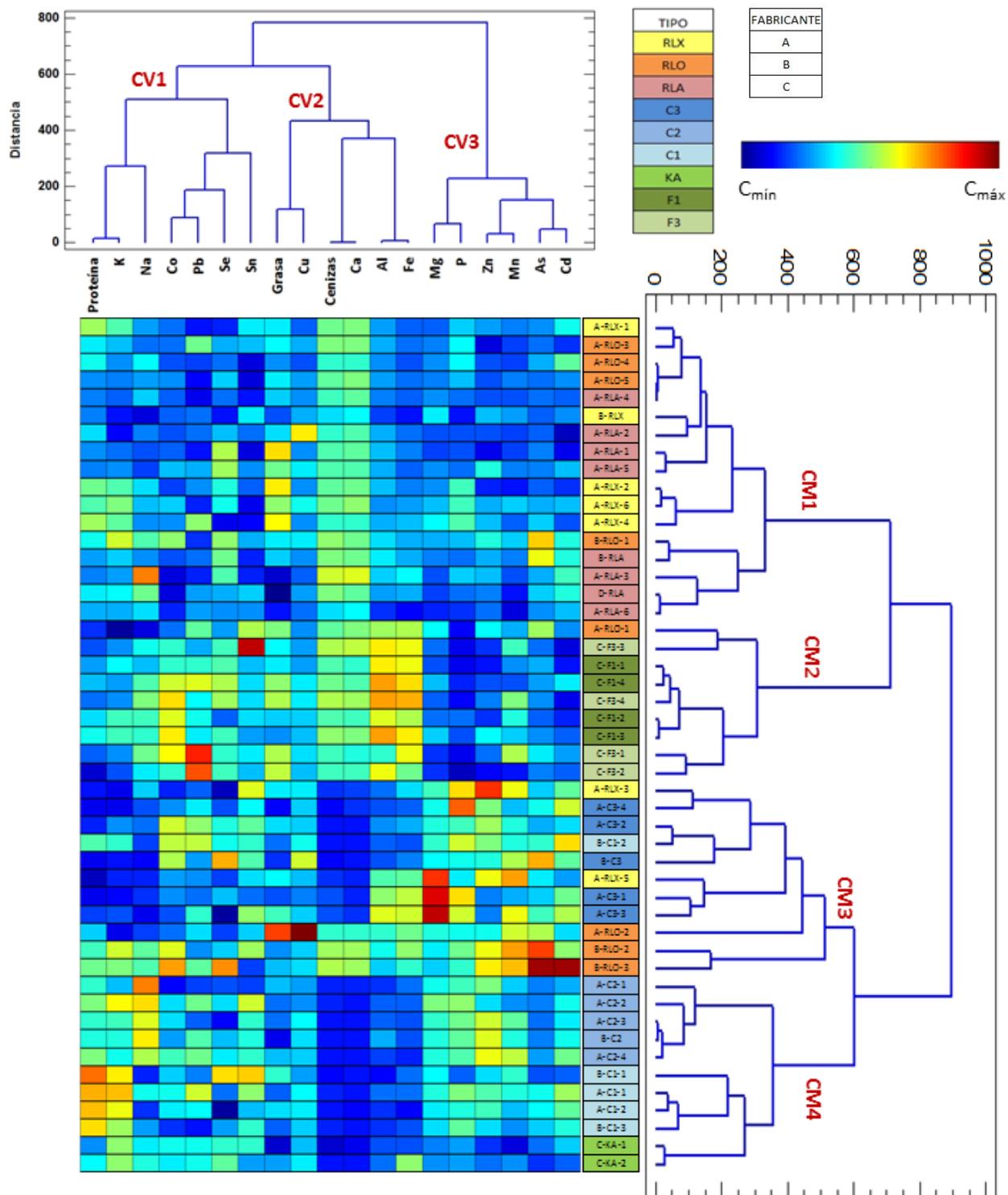


Fig. 4.3. Dendrogramas de variables y muestras obtenidos por el método de Ward.

4.3.2. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

El propósito del análisis en componentes principales o ACP es reducir la dimensionalidad de la matriz de datos (48 muestras \times 16 variables) para facilitar la visualización de las relaciones entre muestras y variables en un espacio bidimensional. Los PCs son combinaciones lineales independientes (ortogonales) de las variables originales, siendo las cargas los coeficientes de cada variable en dicha combinación lineal.

Con el fin de concentrar la varianza de la matriz de datos en un menor número de PCs y facilitar así la interpretación de los agrupamientos de muestras y variables, en este análisis se han eliminado los metales Na, K y Cu debido a que apenas presentan correlación con el resto de parámetros investigados e impiden reducir el número de dimensiones (PCs).

La Tabla 4.4 muestra las cargas (*loadings*), el valor propio, la varianza explicada y la varianza acumulada de los cinco primeros componentes principales obtenidos, que explican conjuntamente el 77,56% de la variabilidad total de los datos experimentales. El criterio usado para decidir el número de componentes principales a retener es que su valor propio sea superior a la unidad, esto es, que explique más varianza que una variable original.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Proteína	0,113	0,143	0,240	0,304	-0,593
Grasa	-0,215	-0,119	-0,096	-0,148	-0,677
Cenizas	-0,381	-0,050	0,283	-0,243	-0,063
Ca	-0,380	-0,015	0,288	-0,230	-0,063
Mg	0,275	-0,189	-0,283	-0,345	0,018
P	0,380	-0,019	0,028	-0,224	-0,074
Al	-0,282	-0,333	-0,230	-0,165	0,080
Fe	-0,221	-0,400	-0,213	-0,132	0,068
Zn	0,340	-0,193	0,161	-0,054	-0,099
Mn	0,184	-0,415	0,029	-0,124	-0,196
Co	-0,065	-0,409	0,120	0,371	-0,001
As	0,093	-0,320	0,471	-0,158	0,042
Se	-0,174	-0,154	0,298	0,366	0,277
Cd	0,304	-0,175	0,360	-0,067	0,138
Sn	0,130	-0,218	-0,275	0,290	0,008
Pb	-0,039	-0,271	-0,184	0,396	-0,138
Valor propio	4,665	3,285	1,877	1,549	1,035
%Varianza	29,157	20,530	11,730	9,682	6,466
%Var. Acumul	29,157	49,687	61,416	71,099	77,565

Tabla 4.4. Cargas de los componentes principales

La representación conjunta de las cargas de los factores PC1 (29,16% de la varianza) y PC2 (20,53% de la varianza) contiene el 49,69% de la información original y permite visualizar las relaciones más importantes entre las 16 variables incluidas en este estudio (Fig. 4.4).

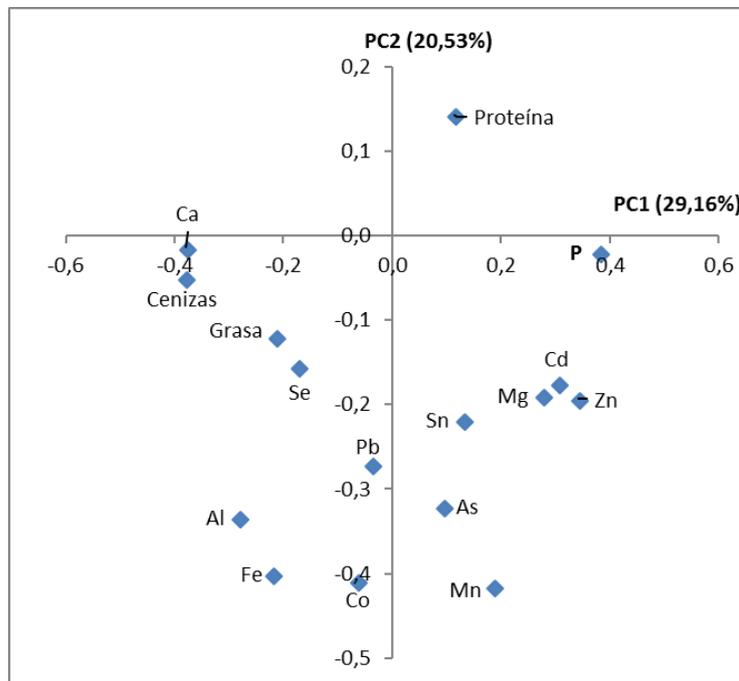


Fig. 4.4. Representación conjunta de las cargas de los factores PC1 y PC2

Las variables fuertemente correlacionadas aparecen agrupadas en el mismo cuadrante del gráfico. El grupo de variables agrupadas con coeficientes positivos en PC1 se pueden dividir en dos subgrupos atendiendo al signo de su carga en PC2. Se observa de nuevo la proximidad entre el Ca y el contenido mineral total, expresado como % cenizas. Los metales Al, Fe, Co y Pb aparecen de nuevo agrupados. En el cuarto cuadrante se agrupan la mayor parte de elementos traza investigados (As, Sn, Cd, Zn) y el P, aunque algo más alejado. La proteína no se agrupa con el resto de parámetros analizados.

La representación de los valores o puntuaciones (*scores*) de las muestras en el espacio definido por los dos primeros componentes principales se muestra en la Fig. 4.5, y muestra las agrupaciones de muestras analizadas en virtud de su similitud composicional. La interpretación conjunta de las gráficas de *loadings* y *scores* permite clasificar las muestras de pienso investigadas en base a las similitudes en su composición química, relacionando la ubicación de la muestra en el gráfico con la abundancia de ciertas variables en la muestra.

Los piensos RLA se encuentran todos juntos en el segundo cuadrante, junto con los RLX, ambos piensos para gallinas ponedoras, las cuales necesitan calcio para la formación de las cáscaras.

Los piensos de recría (C1, C2 y C3) tienen abundancia en proteína, necesaria para crecer, encontrándose todos en la parte derecha del gráfico.

En el cuarto cuadrante hay mezcla de tipos de piensos, los cuales contienen más cantidad de metales [16].

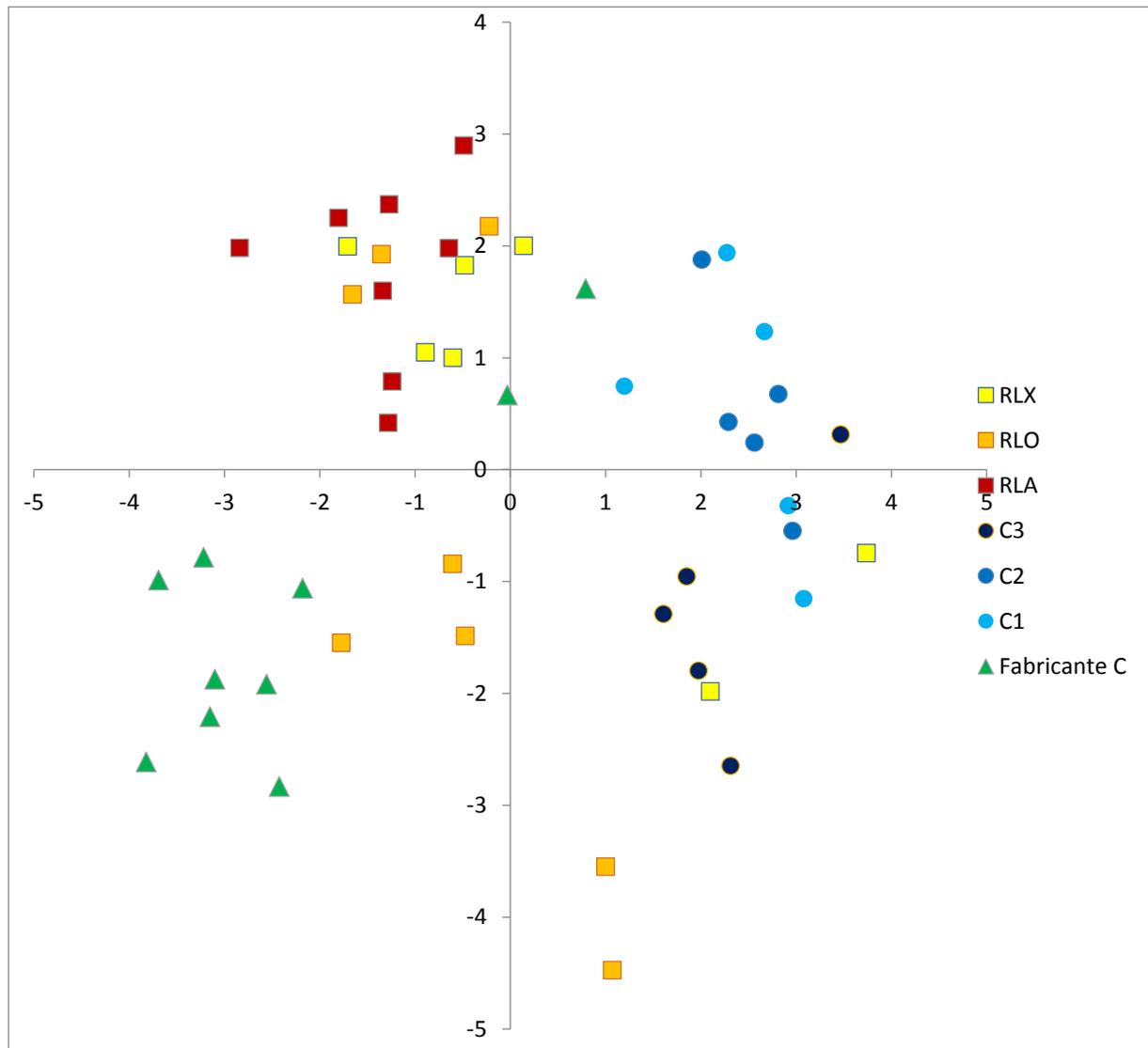


Fig. 4.5. Representación de las puntuaciones de las muestras en los dos primeros PCs.

En los resultados del análisis clúster es más difícil visualizar esa separación de efectos, pero esta herramienta presenta la ventaja de que, complementada con el mosaico de color (o *heat map*), permite no sólo los agrupamientos de muestras y variables y sus interrelaciones, sino también visualizar el nivel de concentración de cada analito en cada muestra mediante un sencillo código de colores.

5. CONCLUSIONES

Se han analizado 19 parámetros químicos en 48 muestras de piensos comercializados en España y destinados a la avicultura, para la cría y mantenimiento de gallinas ponedoras. Las muestras pertenecen a 9 tipos de pienso comercializados específicamente para diferentes etapas del crecimiento, desde la cría hasta la puesta, y provienen de 3 fabricantes. Las variables investigadas en las muestras han sido parámetros nutricionales (proteína, grasa y contenido mineral total), elementos mayoritarios (Ca, K, Mg, Na y P) y elementos traza esenciales y tóxicos (Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Se, Sn y Zn).

El análisis univariante de los resultados (gráficos box plot, ANOVA y test no paramétrico de Kruskal-Wallis) ha demostrado que el factor tipo de pienso predomina sobre el factor fabricante para explicar la variabilidad en la composición elemental y nutricional de las muestras investigadas. Por el contrario, los niveles de algunos micronutrientes y de elementos tóxicos no guardan relación con el tipo de pienso pero varían significativamente entre fabricantes.

El análisis multivariante (análisis clúster y análisis en componentes principales) ha permitido agrupar, por un lado, variables correlacionadas y, por otro, muestras con composición similar. Estos agrupamientos han permitido relacionar diferentes fabricantes y tipos de pienso con variables químicas concretas. Así, se muestra de nuevo que la concentración de nutrientes esenciales está asociada exclusivamente al tipo de pienso. Mientras que el factor fabricante está relacionado con el diferente contenido de elementos traza y tóxicos, que probablemente provienen de las materias primas y, en menor medida, del proceso de fabricación, obteniéndose siempre valores inferiores a los límites máximos permitidos, por lo que la seguridad de estos piensos respecto a su contenido en metales tóxicos está garantizada.

Se concluye que las herramientas estadísticas multivariantes son una potente herramienta clasificatoria que puede ser aplicada en la industria alimentaria para identificar la procedencia, clasificar productos y agruparlos en base a su similitud composicional.

6. REFERENCIAS

- [1] Composición en macronutrientes y etiquetado nutricional. Periago, M. J. (2017). Universidad de Murcia. Recuperado 8 de mayo 2018, de:
<https://es.scribd.com/document/96361635/protocolos-etiquetado-nutricional>
- [2] Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio 1999. Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.
- [3] Reglamento (CE) Nº 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio 2009. Comercialización y utilización de piensos.
- [4] Fuentes de calcio. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). Recuperado 12 de julio 2018, de:
http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/fuentes-de-calcio
- [5] Documentos propios de LABDIAL.
- [6] Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo 2002. Sustancias indeseables en la alimentación animal.
- [7] Comparison and considerations for Nitrogen/Protein analysis of food and feed. Müller, J. (2017). FOSS, available on line.
- [8] Reglamento (CE) Nº 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero 2009. Métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.
- [9] IT-PR de LABDIAL.
- [10] Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. Vega, M., Pardo, R., Barrado, E., & Debán, L. (1998). *Water Research*, 32, 3581-3592.
- [11]. Arsenic, fluoride and other trace elements in a basin located in the Argentina Pampean plain. Barranquero, R., Varni, M., Vega, M., Pardo, R., & Ruiz de Galarreta, A. (2017). *Geologica Acta*, available on line.
- [12] Characterization of regional cold-hydrothermal inflows enriched in arsenic and associated trace-elements in the southern part of the Duero Basin (Spain), by multivariate statistical analysis. Giménez, E., Vega, M., & Timón, S. (2017). *Science of the Total Environment*, 593-594, 211-226.

[13] Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principal component analysis. Helena, B., Pardo, R., Vega, M., Barrado, E., Fernández, J., & Fernández, L. (2000). *Water Research*, 34, 807-8016.

[14] DGT estimates cadmium accumulation in wheat and potato from phosphate fertilizer applications. Pérez, AL. & Anderson, KA. (2009). *Science of The Total Environment*, 407 (18), 5096-5103.

[15] Impact of Phosphate Fertilizer on Cadmium Accumulation in Soil and Vegetable Crops. Al-Faiyz, YS., El-Garawany, MM., Assubaie, FN. & Al-Eed, MA. (2007). *Bull Environ Contam Toxicol*, 78:358–362.

[16] Reglamento (CE) Nº 1334/2003 de la Comisión, de 25 de julio de 2003. Modificación de las condiciones para la autorización de aditivos en la alimentación animal.