

**VALIDACIÓN INTERNA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TOTAL, HIERRO NO HEMO E  
IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO  
HEMO EN ALIMENTOS**

**JORGE ARMANDO ARDILA QUINTERO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES  
BUCARAMANGA  
2009**

**VALIDACIÓN INTERNA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TOTAL, HIERRO NO HEMO E  
IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO  
HEMO EN ALIMENTOS**

**JORGE ARMANDO ARDILA QUINTERO**  
Trabajo de grado para optar el título de: Químico

**Directora**  
**M.Sc**  
**Luz Yolanda Vargas Fiallo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**  
**LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES**  
**BUCARAMANGA**  
**2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander por apoyarme en el desarrollo de este proyecto.

A la profesora Luz Yolanda Vargas Fiallo por dirigir este proyecto y permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo.

Al personal del Laboratorio Químico de consultas Industriales por orientarme durante el desarrollo del proyecto y en especial al Químico Javier Moreno Mendez.

A la nutricionista Adriana Soto Mendez por su apoyo y confianza incondicional.

A mis padres y hermanos por apoyarme en todo momento en la idea de formarme como profesional.

A mis amigos Jennifer, Yury y Cesar.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO.	3
1.1. Generalidades del hierro.	3
1.1.1. Diferentes usos del hierro.	3
1.1.2. Hierro en los sistemas biológicos.	3
1.1.2.1. Clasificación.	5
1.1.2.2. Hierro total.	5
1.1.2.3. Hierro hemo.	5
1.1.2.4. Hierro no hemo.	6
1.1.2.5. Deficiencias dietarias de hierro en la población humana	7
1.1.2.6. Fortificación de alimentos.	7
1.2. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TOTAL EN ALIMENTOS	9
1.2.1. Generalidades de la absorción atómica.	9
1.2.2. Interferencias.	11
1.3. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMO.	11
1.3.1. El grupo hemo.	12
1.3.2. Interferencias en espectrofotometría.	13
1.4. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO NO HEMO.	13
1.4.1. Formación de complejos.	14
1.5. Validación.	14
1.5.1. NTC-ISO/IEC 17025	15
1.5.2. Validación interna de metodologías analíticas.	15
1.5.3. Principales figuras de merito.	16
1.5.3.1. Límite de detección.	16

1.5.3.2. Límite de cuantificación.	16
1.5.3.3. Linealidad.	17
1.5.3.4. Sensibilidad.	17
1.5.3.5. Precisión.	17
1.5.3.6. Exactitud.	17
1.5.3.7. La carta de control analítico.	18
1.6. INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS.	18
1.6.1. Fuentes de incertidumbre. ¿Dónde se ha fallado?.	19
1.6.1.1. Pesada de una muestra en la balanza.	19
1.6.1.2. Medida de un volumen.	21
1.6.1.3. Durante una dilución.	22
1.6.1.4. Construcción de una curva de calibración.	23
1.6.2. Evaluación de la incertidumbre.	23
1.6.2.1. Combinación.	23
1.6.3. Expresión de la incertidumbre.	24
1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	24
1.7.1. Errores aleatorios.	24
1.7.2. Errores sistemáticos.	24
1.7.3. Propagación de errores en los cálculos aritméticos.	25
1.7.4. Análisis de varianza (ANOVA)	25
2. METODOLOGÍA.	27
2.1. Prevalidación.	27
2.1.1. Verificación de patrones y reactivos.	27
2.1.2. Chequeo de procedimientos.	28
2.1.2.1. Hierro total	28
2.1.2.2. Hierro no hemo.	29
2.1.2.3. Hierro hemo.	30
2.1.3. Mantenimiento de equipos.	31

2.1.3.1. Espectrofotómetro.	31
2.1.3.2. Equipo de absorción atómica.	31
2.1.3.3. Equipos menores.	31
2.1.3.4. Calibración de la balanza.	31
2.1.4. Verificación del material volumétrico.	32
2.1.4.1. Protocolo de lavado.	32
2.1.4.2. Verificación de balones aforados.	32
2.1.4.3. Verificación del material volumétrico ajustado por vertido. "EX".	33
2.1.4.4. Cálculo del volumen.	33
2.2. VALIDACIÓN.	34
2.2.1. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro total en alimentos.	34
2.2.1.1. Curva de calibración.	34
2.2.1.2. Intervalo de validación.	34
2.2.1.3. Linealidad.	34
2.2.1.4. Diseño experimental.	35
2.2.1.5. El límite de detección.	36
2.2.1.6. El límite de cuantificación.	37
2.2.1.7. Sensibilidad del método.	37
2.2.1.8. Precisión.	37
2.2.1.9. Exactitud.	37
2.2.2. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro no hemo en alimentos.	37
2.2.2.1. Determinación de la longitud de onda nominal.	37
2.2.2.2. Construcción de la curva de calibración.	38
2.2.2.3. Determinación de la proporción analito acomplejante.	38
2.2.2.4. Estabilidad del complejo.	38
2.2.2.5. Diseño experimental.	38
2.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR HIERRO HEMO EN ALIMENTOS	39

2.3.1. Determinación de la longitud de onda nominal	39
2.3.2. Rango lineal.	39
2.3.3. Sensibilidad del método.	39
2.3.4. Límite de detección.	40
2.3.5. Límite de cuantificación.	40
2.3.6. Análisis de muestras.	40
2.4. ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL.	40
2.5. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE.	40
2.5.1. Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.	40
2.5.2. Incertidumbre en la determinación de hierro total en alimentos.	40
2.5.3. Incertidumbre en la determinación de hierro no hemo en alimentos	42
3. RESULTADOS.	44
3.1. Prevalidación.	44
3.1.1. Verificación de patrones.	44
3.1.2. Mantenimiento de equipos.	44
3.1.2.1. Absorción atómica.	44
3.1.2.2. Espectrofotómetro.	44
3.1.2.3. Balanza.	44
3.1.3. Verificación del material volumétrico.	44
3.2. VALIDACIÓN.	46
3.2.1. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro total en alimentos.	46
3.2.1.1. Curva de calibración.	46
3.2.1.2. Intervalo de validación.	47
3.2.1.3. Linealidad.	47
3.2.1.4. Diseño experimental.	47
3.2.1.5. Límite de detección.	48
3.2.1.6. Límite de cuantificación.	48

3.2.1.7. Sensibilidad del método.	48
3.2.1.8. Precisión.	49
3.2.1.9. Exactitud.	49
3.2.2. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro no hemo en alimentos.	51
3.2.2.1. Longitud de onda nominal.	51
3.2.2.2. Curva de calibración.	52
3.2.2.3. Linealidad.	52
3.2.2.4. Determinación de la proporción analito acomplejante.	54
3.2.2.5. Estabilidad del complejo.	54
3.2.2.6. Diseño experimental.	55
3.2.2.7. El límite de detección.	55
3.2.2.8. El límite de cuantificación.	55
3.2.2.9. Sensibilidad del método.	56
3.2.2.10. Precisión.	56
3.2.2.11. Exactitud.	56
3.3. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMO.	58
3.3.1. Determinación de la longitud de onda nominal.	58
3.3.2. Construcción de la curva de calibración.	58
3.3.3. Sensibilidad del método.	59
3.3.4. Límite de detección.	59
3.3.5. Límite de cuantificación.	60
3.3.6. Determinación de hierro hemo en hemoglobina.	60
3.4. INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TOTAL.	61
3.4.1. Pesada de las muestras.	61
3.4.1.1. Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza.	61
3.4.1.2. Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza.	61
3.4.1.3. Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras.	61
3.4.1.4. Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras.	62

3.4.2. Incertidumbre por dilución de muestras en un balón de 100 mL.	62
3.4.2.1. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.	62
3.4.2.2. Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 100 mL.	62
3.4.2.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 100 mL	62
3.4.2.4. Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.	62
3.4.2.5. Incertidumbre Estándar Relativa por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.	63
3.4.3. Incertidumbre debida al primer factor de dilución (Preparación de la solución madre en la curva de calibración).	63
3.4.3.1. Incertidumbre generada por la pipeta de 10 mL (alícuota).	63
3.4.3.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta.	63
3.4.3.1.2. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.	63
3.4.3.1.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 10 mL.	64
3.4.3.1.4. Incertidumbre combinada de la pipeta de 10 mL.	64
3.4.3.1.5. Incertidumbre Estándar Relativa de la pipeta de 10 mL.	64
3.4.3.2. Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)	64
3.4.3.3. Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución.	64
3.4.4. Incertidumbre debida al segundo factor de dilución (preparación de los patrones a partir de la solución madre)	64
3.4.4.1. Incertidumbre generada por la bureta de 25 mL (alícuota)	65
3.4.4.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la bureta de 25 mL.	65
3.4.4.1.2. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.	65
3.4.4.1.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la bureta de 25 mL.	65
3.4.4.1.4. Incertidumbre combinada de la bureta de 25 mL.	65
3.4.4.1.5. Incertidumbre Estándar Relativa de la bureta de 25 mL.	65
3.4.4.2. Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)	66
3.4.4.3. Incertidumbre estándar relativa del segundo factor de dilución.	66
3.4.5. Incertidumbre Estándar debida al material de referencia certificado	66

con el cual se preparó la curva de calibración.	
3.4.5.1. Incertidumbre Estándar Relativa debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.	66
3.4.6. Incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones usados en la curva de calibración.	66
3.4.7. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.	67
3.4.7.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.	69
3.4.8. Incertidumbre Estándar Relativa debida a la curva de calibración.	69
3.4.9. Incertidumbre combinada del método.	69
3.4.10. Incertidumbre expandida.	70
3.4.11. Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito	70
3.4.12. Expresión del resultado	70
3.5. INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE HNH	70
3.5.1. Incertidumbre estándar relativa debida ala pesada de las muestras	70
3.5.2. Incertidumbre por adición de reactivos.	70
3.5.2.1. Incertidumbre por adición de 10 mL de mezcla ácida (pipeta de 10mL)	70
3.5.2.2. Incertidumbre por medición de 1 mL de muestra digerida (pipeta 1mL)	71
3.5.2.2.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 1mL.	71
3.5.2.2.2. Incertidumbre por efecto de la temperatura. (5°C)	71
3.5.2.2.3. Incertidumbre por la tolerancia de la pipeta de 1 mL.	71
3.5.2.2.4. Incertidumbre combinada de la pipeta de 1ml.	71
3.5.2.2.5. Incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 1mL.	71
3.5.2.3. Incertidumbre por adición de 5 mL de mezcla ácida.	71
3.5.2.3.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 5mL.	71
3.5.2.3.2. Incertidumbre por efecto de la temperatura. (5°C)	72

3.5.2.3.3. Incertidumbre por la tolerancia de la pipeta de 5 mL.	72
3.5.2.3.4. Incertidumbre combinada de la pipeta de 5mL.	72
3.5.2.3.5. Incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 5mL.	72
3.5.2.4. Incertidumbre estándar relativa debida a la dilución por adición de reactivos.	72
3.5.3. Incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones usados en la curva de calibración.	72
3.5.4. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.	73
3.5.4.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.	73
3.5.5. Incertidumbre Estándar Relativa debida a la curva de calibración	73
3.5.6. Incertidumbre combinada del método.	73
3.5.7. Incertidumbre expandida.	74
3.5.8. Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito.	74
3.5.9. Expresión del resultado.	75
3.6. Carta de control analítico.	75
3.6.1. Carta de control analítico de hierro total.	75
3.6.2. Carta de control analítico de hierro no hemo.	76
4. CONCLUSIONES	77
5. RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Hierro en los sistemas biológicos.	4
<b>Figura 1.2.</b> Enlaces del hierro hemo.	6
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de un espectrofotómetro de llama de doble haz.	10
<b>Figura 1.4.</b> Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente	11
<b>Figura 1.5.</b> Representación estructural del complejo Ferroina	14
<b>Figura 1.6.</b> Representación de los términos exactitud y precisión	18
<b>Figura 2.1.</b> Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración.	36
<b>Figura 2.2.</b> Diagrama causa efecto para la determinación de la incertidumbre (1).	41
<b>Figura 2.3.</b> Diagrama causa efecto para la determinación de la incertidumbre (2).	42
<b>Figura 3.1.</b> Verificación de la pipeta de 10 mL.	45
<b>Figura 3.2.</b> Curva de calibración hierro total.	46
<b>Figura 3.3.</b> Espectro de absorción de radiación visible del complejo HNH-Batofenantrolina.	51
<b>Figura 3.4.</b> Evaluación del rango lineal.	52
<b>Figura 3.5.</b> Curva de calibración HNH.	53
<b>Figura 3.6.</b> Absorbancia de 1 mL de patrón de 7 mg/L de HNH con volúmenes variables de agente acomplejante	54
<b>Figura 3.7.</b> Espectro de absorción de hierro hemo	58
<b>Figura 3.8.</b> Curva de calibración de hierro hemo, Patrones leídos a 378.5nm	59
<b>Figura 3.9.</b> Contribución de incertidumbre en la medición de hierro total	69
<b>Figura 3.10.</b> Contribución de incertidumbre en la medición de hierro no hemo	73
<b>Figura 3.11.</b> Carta de control analítico para la cuantificación de hierro total por absorción atómica.	73
<b>Figura 1.31.</b> Carta de control analítico para la cuantificación de hierro no hemo.	76

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Propagación de errores en los cálculos aritméticos.	25
<b>Tabla 1.2.</b> Listado de reactivos.	27
<b>Tabla 2.1.</b> Parámetros de trabajo para el espectrómetro y la llama.	29
<b>Tabla 2.2.</b> Identificación de las fuentes de incertidumbre (1)	41
<b>Tabla 2.3.</b> Identificación de las fuentes de incertidumbre (2)	42
<b>Tabla 3.1.</b> Verificación del material volumétrico.	45
<b>Tabla 3.2.</b> Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de la curva de calibración.	46
<b>Tabla 3.3.</b> Concentración encontrada en las soluciones de trabajo durante 6 días.	47
<b>Tabla 3.4.</b> Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo	50
<b>Tabla 3.5.</b> Cálculo del porcentaje de recuperación a rango alto	50
<b>Tabla 3.6.</b> Lecturas de absorbancia de patrones de hierro.	52
<b>Tabla 3.7.</b> Lecturas diarias de los patrones de la curva de calibración.	53
<b>Tabla 3.8.</b> Absorbancia del complejo HNH-batofenantrolina en el tiempo.	55
<b>Tabla 3.9.</b> Diseño experimental HNH.	55
<b>Tabla 3.10.</b> Porcentaje de recuperación de HNH a bajas concentraciones.	57
<b>Tabla 3.11.</b> Porcentaje de recuperación de HNH a altas concentraciones.	57
<b>Tabla 3.12.</b> Absorbancia de patrones de hierro hemo.	58
<b>Tabla 3.13.</b> Lecturas de un patrón de 0.02 mg/L de hierro hemo.	60
<b>Tabla 3.14.</b> Concentración de hierro hemo en muestras de hemoglobina.	60
<b>Tabla 3.15.</b> Diseño experimental para la curva de calibración.	67
<b>Tabla 3.16.</b> Medida de la concentración de un patrón de 3 mg/L de hierro durante 10 días.	75
<b>Tabla 3.17.</b> Datos de concentración de un patrón de 5 mg/L de HNH	76

## **ANEXOS**

**ANEXO A.** Volumen ocupado por 1.000g de agua pesada en aire contra pesas de acero inoxidable.

**ANEXO B.** Valores de la distribución t de student para un 95% de confianza.

## ABREVIATURAS

- ❖ HT Hierro Total
- ❖ HH Hierro Hemo
- ❖ HNH Hierro no Hemo
- ❖ MCR Material de Referencia Certificado
- ❖ MIBK Metil isobutil cetona
- ❖ LDD Limite de detección
- ❖ U Incertidumbre
- ❖ IRE Incertidumbre Estándar Relativa
- ❖ Uc Incertidumbre combinada
- ❖ %CV Porcentaje de coeficiente de variación
- ❖ IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry
- ❖ NTC Norma Técnica Colombiana
- ❖ ISO International Organization for Standardization
- ❖ AC Antes de cristo
- ❖ AOAC Association of Official Analytical chemists

## RESUMEN

**TITULO: VALIDACIÓN INTERNA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TOTAL, HIERRO NO HEMO E IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO HEMO EN ALIMENTOS. \***

**AUTOR: JORGE ARMANDO ARDILA QUINTERO. \*\***

**PALABRAS CLAVES:** Validación Interna, Hierro Hemo, Hierro no Hemo, Incertidumbre.

### DESCRIPCIÓN

El hierro es un elemento indispensable en la dieta humana y su deficiencia genera graves enfermedades de salud pública entre ellas la anemia. Como solución se plantea la posibilidad de fortificar alimentos de uso masivo con hierro hemo, el cual se encuentra en productos de origen animal y es asimilado fácilmente por los organismos.

Es necesario cuantificar las concentraciones de hierro hemo, hierro no hemo y hierro total en un producto alimenticio fortificado con el fin de poder dosificarlo a un paciente en particular. Las técnicas usadas para su cuantificación deben reportar datos confiables, la norma ISO/IEC 17025:2005, "*Requerimientos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo*", establece la validación analítica como un criterio de confianza en una metodología en particular.

Se realizo la validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro no Hemo y hierro total en alimentos siguiendo el protocolo recomendado por el Instituto Nacional de Salud. Se leyeron durante 6 días un lote compuesto de dos blancos de reactivos (Bk1 y Bk2), dos estándares de concentración conocida ( 0.9C y 0.09C), dos muestras naturales de chocolate (  $M_1$  y  $M_2$ ), dos muestras adicionadas ( $M_1+A_1$  y  $M_2 +A_2$ ). Se evaluaron figuras de merito de las metodologías tales como: Límite de detección límite de cuantificación, sensibilidad, linealidad, precisión, exactitud. Además se implemento el método para cuantificar hierro hemo en alimentos.

Finalmente se realizo el cálculo de la incertidumbre de los resultados de las metodologías validadas.

---

\*Tesis de Grado

\*\* Faculta de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Luz Yolanda Vargas F.

## ABSTRAC

**TITLE:** INTERNAL VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR TOTAL AND NO HEM IRON QUANTIFICATION, AND IMPLEMENTATION OF THE METHOD FOR HEM IRON DETERMINATION IN FOOD\*.

**AUTHOR:** JORGE ARMANDO ARDILA QUINTERO. \*\*

**KEY WORDS:** Internal Validation, Hem Iron, No Hem Iron, Uncertainty.

### DESCRIPTION

Iron is an essential element in the human diet and its deficiency leads to serious health diseases including anemia. As a solution raises the possibility to fortify mass consumption food with hem iron, which is found in animal products and presents easy assimilation in humans.

It is necessary to quantify the concentrations of hem iron, no hem iron and total iron in a fortified food product to be dosed for a particular patient. The techniques used for quantification must report reliable data; the standard ISO / IEC 17025:2005, "*General Requirements for Calibration and Testing Labs Competence*", provides the analytical validation as a criterion of confidence in a particular methodology.

The internal validation of the analytical methods for Hem and total iron quantification in foods was carried out following the protocol recommended by the National Health Institute. A set consisting of two reactive blanks (Bk1 and BK2), two standards of known concentration (0.9C and 0.09C), two natural samples of chocolate (M1 and M2) and two additional samples (A1 + M1 and M2 + A2) was tested during six days. Figures of merit for methodologies such as limit of detection, limit of quantitation, sensitivity, linearity, precision and accuracy were evaluated. Besides, the method for Hem iron quantification in food was implemented

Finally, the uncertainty of the results for the validated methodologies was calculated.

---

\*Degree Project

\*\*Faculty of Sciences, School of Chemistry, Director: M. Sc Luz Yolanda Vargas F

## INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de ensayo y calibración deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para cualquier determinación, y por esta razón la selección de dichos métodos debe ser rigurosa. Se deben escoger metodologías, en lo posible, normalizadas, publicadas nacional o internacionalmente que satisfagan las necesidades de los clientes. La norma NTC-ISO/IEC 17025 obliga a los laboratorios de ensayo y calibración a usar procedimientos normalizados y publicados, o procedimientos no normalizados que han sido validados, esto con el fin de confiar en los resultados emitidos por dichas organizaciones.

La validación es la herramienta que permite obtener evidencia que confirma la pertinencia de una metodología para un uso previsto. Muchas metodologías necesitan ser validadas ya que son jóvenes o su uso no es generalizado. En la industria de alimentos existen diversas determinaciones cuantitativas no normalizadas que requieren de su validación para que puedan ser aplicadas por una organización en particular. Tal es el caso de las determinaciones de HT, HH y HNH en alimentos.

El hierro es uno de los elementos menores más importantes de la dieta humana y su deficiencia genera graves enfermedades como la anemia, considerada actualmente un problema de salud pública. Como solución a este problema se plantea la posibilidad de fortificar alimentos de consumo masivo con hierro, para suplir los requerimientos dietarios de éste elemento. La fortificación de alimentos con hierro se realiza generalmente con la adición de sales inorgánicas, pero actualmente surge la idea de adicionar concentrados de hemoglobina.

El presente trabajo plantea la posibilidad de validar técnicas analíticas para la cuantificación de hierro total y no hemo, e implementar una metodología para determinar hierro hemo, en diversos alimentos; ya que se necesitan procedimientos confiables que permitan desarrollar dichas mediciones en nuestro país. La validación incluye la determinación de las siguientes figuras de merito: límite de detección, límite de cuantificación, correlación lineal, sensibilidad, precisión, exactitud y un cálculo de la incertidumbre de cada uno de los métodos validados.

El Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander por medio de este proyecto pretende dar respuesta a la necesidad que existe de cuantificar hierro total, hierro no hemo y hierro hemo, implementando y validando de forma interna las técnicas que actualmente existen en otras naciones pero que en ningún momento han sido normalizadas.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. GENERALIDADES DEL HIERRO

El hierro es el metal más abundante en el universo, y el cuarto elemento en frecuencia en la corteza terrestre. Se encuentra naturalmente en el suelo, formando parte de diversos minerales, en el agua y en muchos alimentos. Algunos datos de importancia química se describen a continuación: símbolo Fe, número atómico 26, peso atómico relativo 55.845 g/mol, niveles de oxidación 2 y 3, configuración electrónica  $[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$ <sup>[14]</sup>.

#### 1.1.1. Diferentes usos del hierro.

La relación del hierro con el hombre desde inicios de la historia de la humanidad, lo ha llevado a darle usos, que van desde la forja del hierro, que significó un hito en la historia de la humanidad, hasta su utilización como medicamento, ya que formó parte de las recetas médicas más antiguas, como en el papiro de Eber en Egipto, 1500 años A.C., donde el óxido férrico era utilizado como ungüento para el tratamiento de la calvicie, o en Grecia, 1200 años A.C., donde era mezclado con vino como tratamiento de la impotencia sexual masculina. También Susruta, médico indio contemporáneo de Buda, 500 años A.C., menciona los efectos beneficiosos de distintos preparados de hierro sobre la salud humana.

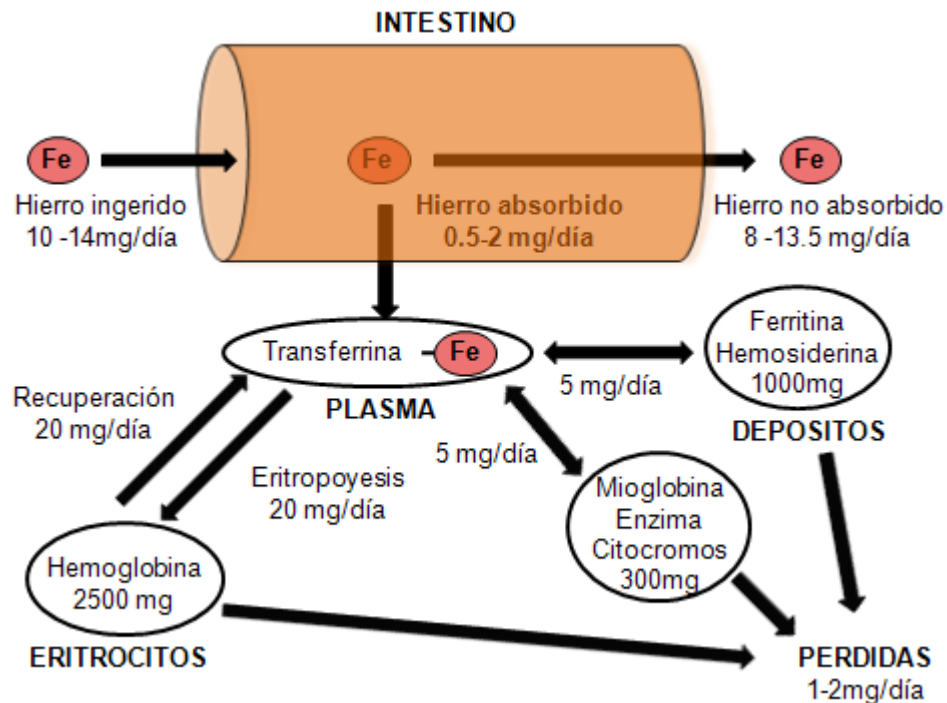
#### 1.1.2. Hierro en los sistemas biológicos

Las principales funciones biológicas que posee el hierro, se basan en sus propiedades oxido-reductoras, ya que los estados de oxidación del hierro van desde 2 a 6, la interconversión entre estos estados de oxidación le otorgan a este elemento propiedades fisicoquímicas particulares que le permiten participar en la transferencia de electrones como así también de unirse en forma reversible a diferentes ligandos entre los más importantes se encuentran, los átomos de

oxígeno, nitrógeno y azufre. Esta característica le confiere a este elemento propiedades biológicas especiales que le permiten participar en un gran número de procesos bioquímicos, generalmente a través de su asociación con diversas biomoléculas, especialmente las proteínas, muchas de las cuales poseen actividad enzimática.

Entre las proteínas que contienen átomos de hierro en su estructura están: enzimas que contienen hierro ligado a azufre; enzimas que contienen hierro bajo la forma de hemo y enzimas que contienen hierro pero no bajo la forma hemo, ni enlazado al azufre.

Figura 1.1. Hierro en los sistemas biológicos.



Estas características particulares del hierro, sumadas a la gran variedad y diversidad de estructuras biológicas a las cuales se encuentra asociado, hacen que este elemento intervenga en múltiples y vitales procesos bioquímicos y fisiológicos como por ejemplo: el transporte y almacenamiento de oxígeno a través de la hemoglobina; en el metabolismo muscular, al formar parte de la mioglobina

que permite el pasaje del oxígeno desde los eritrocitos a las mitocondrias del músculo. Forma parte del sitio activo de los citocromos, los que intervienen en múltiples y variadas vías metabólicas como las relacionadas con el metabolismo energético, con el sistema enzimático microsomal P-450, el que participa en la síntesis de diversos esteroides como la aldosterona, corticosterona, pregnenolona, vitamina D<sub>3</sub>, etc <sup>[11]</sup>. Este sistema también interviene en la degradación de distintos metabolitos, drogas, fármacos y diferentes sustancias tóxicas. Por otra parte, el hierro, al formar parte de casi todas las oxidasas de los mamíferos, demuestra la variedad de procesos metabólicos y fisiológicos en los cuales este elemento está involucrado <sup>[3,6]</sup>.

#### **1.1.2.1. Clasificación**

Como se ha mencionado el hierro en los sistemas biológicos forma parte de diversas sustancias de las cuales podemos destacar las proteínas denominadas hemoproteínas, muchas de estas participan en el transporte y metabolismo del oxígeno. Podemos además encontrar el hierro en el plasma sanguíneo y en otros fluidos corporales en forma de sales inorgánicas. De acuerdo al entorno químico, el hierro se ha clasificado en tres categorías que se describen a continuación.

#### **1.1.2.2. Hierro total**

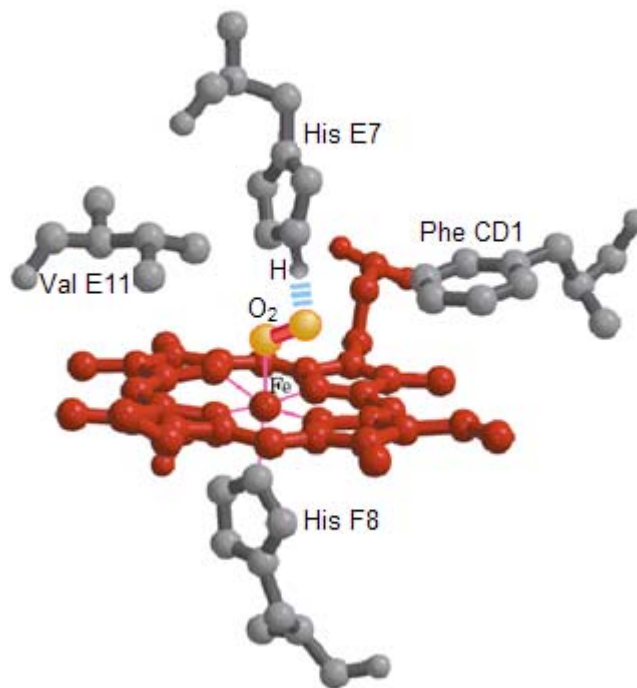
Se considera dentro de esta categoría, a la suma cuantitativa de todas las formas químicas de hierro dentro de un sistema. Incluye el hierro de sales inorgánicas, hemoproteínas y hierro asociado a materia orgánica en forma diferente al grupo hemo <sup>[7]</sup>.

#### **1.1.2.3. Hierro hemo**

El HH forma parte de proteínas como la hemoglobina, mioglobina, citocromos y muchas hemoproteínas, que se encuentran únicamente en los alimentos de origen animal, estas se encargan del transporte y metabolismo del oxígeno. El hierro en forma divalente se encuentra quelado con un anillo de porfirina estableciendo un

complejo denominado grupo hemo, en donde forma seis enlaces coordinados, 4 con los nitrógenos de la porfirina, 1 con un nitrógeno de origen proteínico y el enlace restante “esta libre” para unir la molécula de oxígeno como se muestra en la figura 1.2. El hierro en el anillo de porfirina puede encontrarse en forma trivalente, esta forma oxidada del grupo hemo se denomina hemina y presenta menos estabilidad que en grupo hemo con el hierro en estado divalente.

*Figura 1.2. Representación estructural del grupo hemo en la hemoglobina*



#### **1.1.2.4. Hierro no hemo**

El HNH corresponde al hierro que no se encuentra unido al grupo hemo; básicamente está formado por sales inorgánicas de este metal, se encuentra principalmente en los alimentos de origen vegetal, y en la mayoría de los preparados farmacéuticos utilizados en la terapia contra la deficiencia de este bioelemento <sup>[32]</sup>.

#### **1.1.2.5. Deficiencias dietarias de hierro en la población humana**

La anemia nutricional es un problema de salud pública a nivel mundial, la padecen en su gran mayoría niños en edad preescolar y mujeres embarazadas, es detectada al encontrar en los pacientes una franca disminución en la concentración de hemoglobina y por una disminución en la concentración del hierro plasmático (inferior a los 40 µg/dL). Esta enfermedad deteriora la calidad de vida de quien la padece, generando problemas de concentración, desaliento generalizado, palidez, mareos e interfiere en los procesos de aprendizaje en los niños <sup>[1,8]</sup>.

#### **1.1.2.6. Fortificación de alimentos**

En la Edad Media y Renacimiento, se utilizó al hierro para el tratamiento de ciertas enfermedades, pero sin mucho conocimiento de causa. A comienzos del siglo XVI se relacionó la deficiencia de hierro con una enfermedad llamada "enfermedad verde" o clorosis (nombre que se le asignaba a la anemia ferropénica en esa época, debido al color amarillo-verdoso que adquiría la piel de quienes la padecían), que afectaba a las mujeres adolescentes y cuyos síntomas eran decaimiento, cansancio y palidez. La primera persona en utilizar el hierro como medicamento específico en el tratamiento de la clorosis fue Sydenham, quien a su vez eliminó las sangrías y purgas de la época.

En 1713, Lemery y Geoffry demostraron por primera vez que el hierro se encontraba presente en las cenizas de la sangre, relacionando directamente a este tejido con dicho metal, estableciendo de esta manera las bases científicas en la terapéutica de su deficiencia. En 1832 el médico francés Pierre Bland inició el tratamiento de la clorosis mediante la administración de hierro por vía oral, utilizando una píldora compuesta por sulfato ferroso y carbonato de potasio, la cual fue denominada "píldora de Bland". Posteriormente durante muchos años y hasta la última década del siglo XIX se siguió tratando la clorosis según los principios de Sydenham y Bland. Sin embargo, Bunge, uno de los primeros

científicos en cuantificar el hierro del organismo y de muchos alimentos, menospreció la píldora de Bland la cual se venía usando en forma masiva en esa época, ya que al analizar las heces de las personas que consumían dichas píldoras encontró hierro en las mismas, interpretando por lo tanto que el hierro de las píldoras no se absorbía. Además, como consecuencia de las teorías vitalistas imperantes en esa época, Bunge, creía que ninguna forma de hierro inorgánico podía ser precursor de la sangre. Si bien la teoría de Bunge fue atacada por numerosos científicos antes que acabara el siglo, en 1920 volvió a tener vigencia cuando Whipple y colaboradores demostraron que el hígado cocido era más eficaz que el carbonato ferroso en la regeneración de la sangre.

En 1932, Castle y colaboradores demostraron la eficacia del hierro inorgánico en la regeneración de la hemoglobina, cuando era administrado por vía parenteral a pacientes con anemia hipocrómica. Sin darse cuenta estos autores estaban dando las bases que explican las diferencias de biodisponibilidad de HH y HNH. La absorción de hierro se realiza en el duodeno y en el yeyuno superior del sistema gastrointestinal, el HNH se puede encontrar en dos formas: férrica y ferrosa, siendo la primera insoluble en medios alcalinos (como en el intestino), por tanto el hierro en estado férrico se precipita en forma de sales que son expulsadas en las heces. El hierro ferroso es más soluble en medio alcalino y puede ser absorbido en un 5% de la cantidad total administrada, sin embargo muchas sustancias como los polifenoles interfieren en su absorción, formando complejos insolubles no asimilables. El calcio en concentraciones superiores a las del hierro interfiere en su asimilación significativamente, compitiendo en los procesos de absorción proteínica.

Por otra parte el HH es soluble en medios alcalinos y su biodisponibilidad es muy superior a la del HNH (> 15%), su asimilación es directa y prácticamente ninguna sustancia interfiere en su asimilación, exceptuando el calcio que afecta la biodisponibilidad a concentraciones elevadas [1, 33].

## **1.2. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TOTAL EN ALIMENTOS**

Para el análisis elemental de la materia encontramos, entre otras, técnicas gravimétricas, titrimétricas, electroquímicas y espectrofotométricas, estos procedimientos aprovechan diversas propiedades de los elementos y compuestos para su correcto aislamiento y cuantificación. El hierro puede cuantificarse en diversas matrices (agua, suelos y tejidos) esencialmente por dos técnicas; mediante la formación de complejos coloreados cuantificables o por absorción atómica. En el análisis de aguas el hierro en su estado de oxidación reducido es acomplejado por la 1,10-fenantrolina formando un complejo estable que absorbe radiación electromagnética en la región visible del espectro, la absorción es directamente proporcional a la concentración del complejo en la muestra y es por tanto cuantificable dentro de rangos permitidos. En matrices más complejas como en el caso de alimentos la absorción atómica presenta las mejores ventajas debido a que se logran eliminar en su totalidad las interferencias de la matriz.

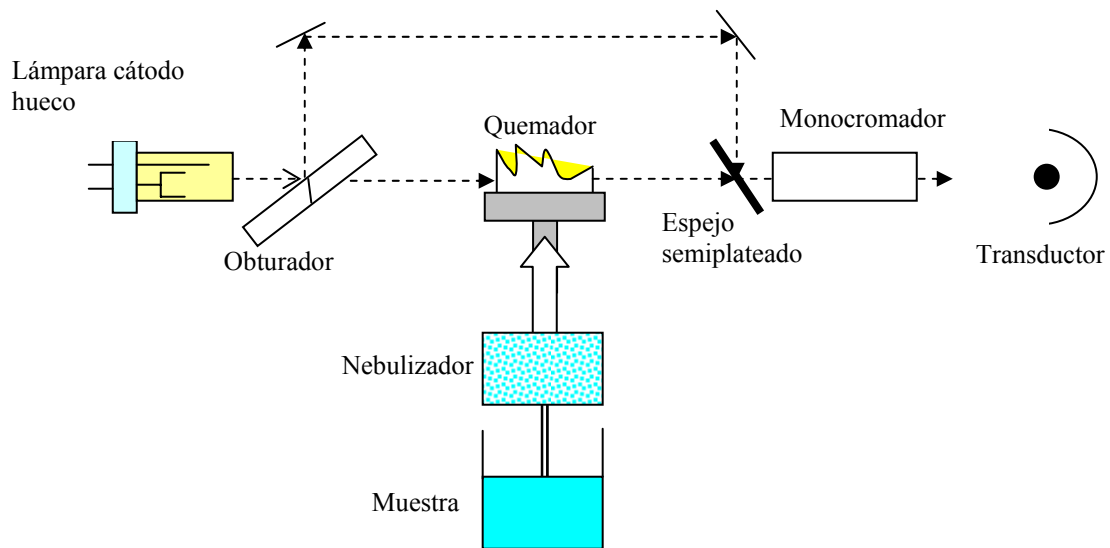
### **1.2.1. Generalidades de la absorción atómica.**

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica de medición de magnitudes químicas de elementos químicos (análisis cuantitativo), cuyo principio es la medición de la radiación absorbida característica del elemento químico a medir, la medición se realiza al hacer incidir, sobre el elemento químico, una radiación proveniente de una fuente independiente de luz monocromática específica para el elemento a medir, la radiación absorbida se determina por diferencia, entre la radiación incidente y la transmitida <sup>[34]</sup>.

Este método permite llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de entre 70 a 80 elementos. Los límites de detección para muchos de estos elementos son menores a una parte por mil millones. La espectroscopía atómica puede estar basada en la medición de absorción, emisión o fluorescencia, de las cuales la espectroscopía de absorción atómica es la que más se utiliza de las tres. En esta es necesario llevar la muestra a un estado de vapor atómico. Este proceso,

conocido como atomización, consiste en volatilizar la muestra y descomponerla en sus átomos y quizá algunos iones gaseosos. Para la atomización de las muestras se utilizan principalmente atomización a la flama y la atomización al horno. El principio de operación de un espectrómetro de absorción atómica se muestra en la figura 1.3. La radiación del elemento que interesa, cuya fuente de luz suele ser una lámpara de cátodo hueco, se dirige a través de una flama que contiene el gas atómico. La solución del analito se nebuliza por medio de un atomizador o nebulizador en finas gotitas y se lleva a la flama. El disolvente de las gotas se evapora de inmediato y las partículas de sal se descomponen en sus átomos, iones y electrones. Los átomos de la muestra absorberán la radiación que emita el mismo átomo en la lámpara de cátodo hueco, con lo que se atenúa la energía de la fuente. Mediante un monocromador se separa la línea espectral del elemento que interesa de cualquier otra radiación que venga de la fuente o de la flama. La energía radiante de la flama se transforma en corriente eléctrica mediante un tubo fotomultiplicador <sup>[34]</sup>.

*Figura 1.3. Esquema de un espectrofotómetro de flama de doble haz*



El análisis cuantitativo basado en la ley de Beer, para la absorción molecular, se aplica igualmente a la absorción atómica. Este método es bastante selectivo

debido a que las líneas que emite la lámpara de cátodo hueco son muy finas (0,002 a 0.005 nm).

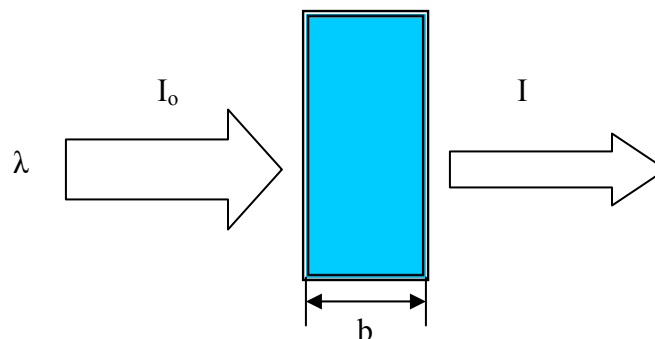
### 1.2.2. Interferencias

Las interferencias en absorción atómica son tradicionalmente clasificadas en espectrales, químicas y físicas. Las interferencias espectrales se generan cuando dos elementos absorben a longitudes de onda muy similares, por ejemplo, la absorción del cobre ocurre a 324.754 nm y la absorción del europio es a 324.753 nm, un equipo de baja resolución no genera longitudes de onda diferenciables en la tercera cifra decimal, presentando problemas para su cuantificación. Las interferencias químicas se presentan cuando se forman en solución compuestos muy estables que no se disocian en la atomización como por ejemplo la formación de sulfatos y fosfatos con metales alcalinos y alcalinotérreos. Las interferencias físicas ocurren cuando hay sólidos en suspensión que taponan los ductos y dañan la atomización de la muestra.

### 1.3. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMO

Cada especie molecular tiene la capacidad de absorber su propia frecuencia característica de la radiación electromagnética, tal como se describe en la figura 1.4 este proceso transfiere energía a las especies absorbentes y provoca una disminución en la intensidad de radiación electromagnética incidente. La ley de Lambert - Beer da información cuantitativa de cómo es que la atenuación de la radiación depende de la concentración de las especies que absorben.

*Figura 1.4. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente*



Con base a la Ley de Lambert - Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de masa de la(s) especie(s) que absorbe(n) para un conjunto de condiciones instrumentales establecidas. A continuación se muestran las expresiones matemáticas usuales de la Ley de Lambert - Beer:

$$\alpha = a b \gamma \quad \text{y} \quad \alpha = \log (I_0 / I)$$

Donde  $\alpha$  es la absorbancia del elemento químico a medir,  $a$  es el coeficiente de absorptividad,  $b$  es la longitud del paso óptico,  $\gamma$  es la concentración de masa de la especie que absorbe,  $I_0$  es la radiación incidente y  $I$  es la radiación transmitida <sup>[34]</sup>.

Como se ha descrito en apartados anteriores, el hierro hemo se denomina al hierro que forma un complejo con un anillo de porfirina, este complejo absorbe radiación electromagnética en la región visible y por tanto es cuantificable por espectrofotometría. La técnica que permite cuantificar esta clase de hierro será aquella en la cual se logre aislar el grupo hemo de la matriz de forma apropiada para no arrastrar interferencias y luego dicho complejo aislado pueda ser cuantificado <sup>[2,21]</sup>. En Japón Harumi y colaboradores desarrollaron una metodología que permite cuantificar hierro hemo en alimentos de forma reproducible. En este trabajo la muestra es sometida a un proceso de extracción con un solvente de tipo orgánico la metil isobutil cetona (MIBK) en condiciones ácidas, en este paso el solvente arrastra el grupo hemo desde las entrañas de la matriz y lo solubiliza mediante la acción del ultrasonido, posteriormente se adiciona agua para separa la parte orgánica de la inorgánica. En la parte orgánica se encuentra el complejo de interés, éste es cuantificado por espectrofotometría interpolando la absorbancia en una curva de calibración <sup>[28]</sup>.

### **1.3.1. El grupo hemo**

Los complejos estables de hierro poseen una estructura octaédrica en la cual el hierro forma 6 enlaces coordinados con diferentes quelantes, en el caso de las

hemoproteínas el hierro forma cuatro enlaces con los nitrógenos del anillo de porfirina, un enlace con un resto proteínico y un enlace con una molécula de oxígeno. El átomo de hierro en el grupo hemo aislado sólo forma 4 enlaces coordinados y por tanto la estabilidad del complejo disminuye, el átomo del metal eventualmente puede salir del anillo de porfirina y pasar a formar parte del hierro no hemo, para que esto no ocurra se debe estabilizar el complejo del grupo hemo permitiendo que el átomo de hierro aumente su número de coordinación de 4 a 6 en donde es más estable, esto se logra mediante la adición de un anión como el nitrito, este quelante puede formar enlaces coordinados con el hierro en las posiciones faltantes, completar el octaedro y estabilizar el grupo hemo evitando que el hierro pierda su correcta posición dentro del anillo de porfirina <sup>[16, 23]</sup>.

### **1.3.2. Interferencias en espectrofotometría**

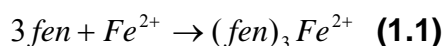
En las cuantificaciones por espectrofotometría pueden existir diversas interferencias, en la mayoría de los casos provenientes de la matriz. La principal interferencia se debe a la presencia de sólidos en suspensión que atenúan la radiación en las lecturas y se determinan valores de absorbancia erróneas; en una matriz en particular pueden existir dos o más moléculas que absorban radiación a la misma longitud de onda y esto lleva a interpretar datos equivocados.

### **1.4. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO NO HEMO**

Como se describió en el apartado 1.1.2.4. El hierro no hemo se encuentra libre en forma de sal inorgánica disuelta en diversos fluidos, una técnica que permita la cuantificación de HNH debe ser aquella que logre extraer el HNH de la matriz y logre su cuantificación. Algunos autores han trabajado al respecto, J. King en su trabajo “Evaluación de hierro no hemo en hemoglobina concentrada” propone extraer el HNH de la matriz con una mezcla ácida que a su vez permite la reducción del estado de oxidación del hierro y un ajuste de pH para acomplejarlo con un derivado de la fenantrolina llamado batofenantrolina, el complejo formado puede ser cuantificado según la ley de Beer <sup>[22, 29, 35]</sup>.

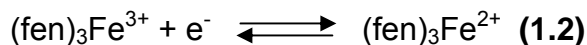
### 1.4.1. Formación de complejos

Algunas variedades de compuestos orgánicos como 1,10-fenantrolinas (u ortofenantrolinas), forman complejos estables con hierro (II). El compuesto original tiene un par de átomos de nitrógeno localizados en posición tal que cada uno forma un enlace covalente coordinado con el hierro (II) iónico. El complejo se forma (ecuación 1.1) por la combinación de tres moléculas de ortofenantrolina con un ión de hierro (II) como se muestra en la figura 1.5.



Incoloro                  Rojo

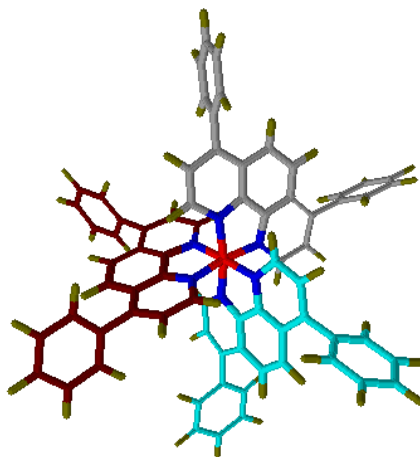
El cambio de color de esta reacción va desde casi incoloro a rojo. Este complejo conocido como ferrioxalato, experimenta una reacción de oxidación-reducción reversible, que se puede representar con la ecuación 1.2. En la práctica, el color de la forma oxidada es demasiado tenue como para ser detectado.



Azul pálido                  Rojo

Figura 1.5. Representación estructural del complejo Ferrioxalato

- Hidrógeno
- Carbono
- Carbono
- Carbono
- Nitrógeno
- Hierro



### 1.5. VALIDACIÓN

El análisis químico se considera actualmente un proceso mediante el cual se obtiene información en un material. Se realizan millones de análisis cada día en el

mundo en los ámbitos más variados, que van desde análisis de productos manufacturados hasta análisis forenses. En todos ellos se requiere una confianza de los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas junto con otras actividades englobadas en la gran área de aseguramiento de la calidad otorga la confianza necesaria al análisis realizado.

Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez para un uso predicho <sup>[31]</sup>. El proceso de verificación se realiza experimentalmente y la documentación se obtiene siguiendo un protocolo que incluye la evaluación de parámetros matemático-estadístico y operativo-económico, sobre la metodología.

#### **1.5.1. NTC-ISO/IEC 17025**

La norma internacional **ISO/IEC 17025** “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración” en su segunda edición, especifica que los laboratorios deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos o las calibraciones dentro de su alcance.

Cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido: publicados en normas internacionales, publicados en libros o revistas técnicas especializadas, publicados por organizaciones técnicas reconocidas o especificados por el fabricante del equipo. También se pueden utilizar los métodos desarrollados por el laboratorio o los métodos adoptados por el laboratorio, si son apropiados para el uso previsto y si han sido validados <sup>[26]</sup>.

#### **1.5.2. Validación interna de metodologías analíticas**

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y las modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para ser aplicados. <sup>[5, 9, 17]</sup>.

### 1.5.3. Principales figuras de merito

Dentro de la evaluación matemático-estadística, de una metodología analítica se deben especificar los parámetros de calidad, estos parámetros describen, los rangos y condiciones de trabajo de las técnicas, sus atributos y sus limitaciones, en los siguientes 7 ítems se describen algunos de los más importantes <sup>[10, 12, 15]</sup>.

#### 1.5.3.1. Limite de detección

El límite de detección (LDD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado.

En una definición más reciente, la ISO [ISO, 1997] introduce el término general “concentración neta mínima detectable” como la concentración neta verdadera del analito en el material sujeto a análisis que conducirá, con una probabilidad  $(1-\beta)$ , a la conclusión de que la concentración de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco. La IUPAC [IUPAC, 1995], en un documento preliminar, proporciona una definición similar y adoptaba el término ‘valor (verdadero) mínimo detectable’, como equivalente al límite de detección.

De acuerdo con las definiciones de la ISO y la IUPAC, el LDD es un parámetro del método analítico definido *a priori*, porque se fija *antes* de que se realice la medida. El LDD es pues esencialmente diferente a la decisión sobre si se detecta un analito o no, puesto que dicha decisión se toma una vez se conoce el resultado de la medida. En otras palabras: *a posteriori* <sup>[4]</sup>.

#### 1.5.3.2. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración mas baja que se puede determinar por un método analítico de forma reproducible, con criterios de exactitud y precisión conocidos. En el laboratorio el límite de cuantificación se realiza mediante la preparación de un número estipulado de blancos a los cuales se realiza la cuantificación del analito de interés <sup>[18]</sup>.

#### **1.5.3.3. Linealidad**

La linealidad muestra la proporcionalidad que existe entre la concentración (cantidad) de analito presente en la muestra y la señal con la cual se cuantifica el analito <sup>[20]</sup>.

#### **1.5.3.4. Sensibilidad**

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio de las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar <sup>[27]</sup>.

#### **1.5.3.5. Precisión**

Este término se utiliza para describir que tan reproducibles son las mediciones; es decir, qué tan semejantes son los resultados que se han obtenido exactamente de la misma manera. Por lo general, la precisión de una medición se puede determinar simplemente repitiendo la medición en porciones semejantes de la muestra.

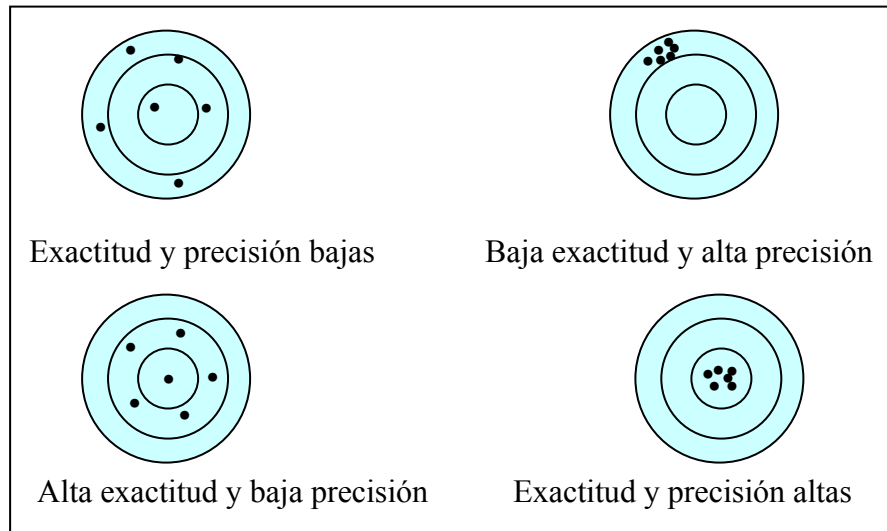
Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: La desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación <sup>[27]</sup>.

#### **1.5.3.6. Exactitud**

El término exactitud indica qué tan cercana está una medición de su valor verdadero o aceptado, y se expresa como error. Es pertinente mencionar la diferencia fundamental entre exactitud y precisión. La exactitud mide la concordancia entre un resultado y su valor verdadero; la precisión mide la concordancia entre varios resultados <sup>[19]</sup>. La precisión se determina sólo repitiendo una medición, en tanto que la exactitud no puede determinarse cabalmente ya que no es posible conocer el valor verdadero de una cantidad; así, en su lugar se debe

emplear un valor aceptado. La exactitud se expresa en términos de error absoluto o error relativo, esta diferencia se puede observar claramente en la figura 1.6.

*Figura 1.6. Representación de los términos exactitud y precisión*



### **1.5.3.7. La carta de control analítico**

La carta de control analítico es una herramienta estadística que permite monitorear el comportamiento de los resultados de una metodología a lo largo del tiempo. En la mayoría de las organizaciones se lleva una carta de control analítico para las metodologías de interés. La carta se construye midiendo a lo largo del tiempo una muestra o un patrón de referencia, con el acumulado de las mediciones se calcula la desviación estándar de las medidas y se fijan unos límites. Los límites de advertencia y los límites de control; los límites de advertencia por lo general corresponden a dos desviaciones estándar por debajo y por encima del promedio de las mediciones y los límites de control, tres desviaciones estándar por debajo y por encima del promedio de las mediciones.

### **1.6. INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U”**

En la búsqueda de resultados confiables los analistas descubren que una muestra analizada un número definido de veces proporciona diferentes valores aunque

cada una de las determinaciones se realice de la misma muestra y bajo condiciones de trabajo idénticas. Los resultados oscilarán dentro de un rango. Esto es debido a los errores que se pudieron cometer durante el análisis. Cada paso a seguir durante el análisis tiene asociado un error inherente, al cometer dichos errores, las medidas realizadas no serán verdaderas, oscilarán dentro de un rango llamado incertidumbre. Es necesario identificar cada una de las fuentes de incertidumbre, evaluarlas y finalmente estimar el aporte de cada fuente a la incertidumbre total del análisis.

Es importante diferenciar los términos error e incertidumbre. Error es la diferencia entre el valor medido y el valor convencionalmente verdadero, del objeto que se está midiendo. Incertidumbre es la cuantificación de la duda que se tiene sobre el resultado de la medición. Cuando sea posible se trata de corregir los errores conocidos por ejemplo, aplicando las correcciones indicadas en los certificados de calibración. Pero cualquier error que no se conozca su valor es una fuente de la incertidumbre <sup>[13]</sup>.

#### **1.6.1. Fuentes de incertidumbre. ¿Donde se ha fallado?**

Un análisis en particular está compuesto en la mayor parte de los casos por varios pasos, cada uno de ellos tiene asociado un valor de incertidumbre en la medida, por ejemplo, una labor tan sencilla como la pesada de una muestra está influenciada por factores internos y externos que afectan el valor reportado por la balanza <sup>[24]</sup>. A continuación se describen algunos procedimientos comunes en el laboratorio con sus aportes de incertidumbre.

##### **1.6.1.1. Pesada de una muestra en la balanza.**

La balanza es un instrumento esencial en todos los laboratorios de ensayo, la mayoría de los análisis incluyen la pesada dentro de sus procedimientos, ya sea pesando la muestra para el análisis o los reactivos que hacen parte de la metodología.

Una balanza analítica es un instrumento delicado. Se debe consultar al instructor sobre los detalles para pesar con el modelo particular de balanza que se tenga. Se deben seguir las siguientes reglas generales para trabajar con una balanza analítica, cualquiera que sea la marca o modelo.

- ❖ Centrar la carga sobre el platillo lo mejor que se pueda.
- ❖ Proteger la balanza de la corrosión. Los objetos que se coloquen sobre el platillo deben limitarse a metales no reactivos, plásticos no reactivos y vidrio.
- ❖ Consultar con el instructor si la balanza parece necesitar ajuste.
- ❖ Dejar siempre que un objeto que haya sido calentado, regrese a la temperatura ambiente antes de pesarlo.

Aún siendo precavidos, existen errores a la hora de pesar. Se prosigue a describir en forma detallada cada fuente de error al pesar <sup>[25]</sup>.

### **Corrección por flotación.**

Un error por flotación afectará los datos si la densidad del objeto que se pesa difiere significativamente de los pesos estándar. El origen de este error es la diferencia de la fuerza de flotación ejercida por el medio (aire) sobre el objeto y los pesos estándar. La corrección para la flotación se obtiene por medio de la ecuación 1.3.

$$W_1 = W_2 + W_2 \left( \frac{d_{aire}}{d_{objeto}} - \frac{d_{aire}}{d_{pesa}} \right) \quad (1.3)$$

En donde  $W_1$  es la masa corregida del objeto,  $W_2$  es la masa de los pesos estándar,  $d_{objeto}$  es la densidad del objeto,  $d_{pesa}$  es la densidad de los pesos y  $d_{aire}$  es la densidad del aire desplazado por ellos y tiene un valor de  $0.0012 \text{ g/cm}^3$  <sup>[25]</sup>.

### **Efectos de la temperatura**

Los intentos para pesar un objeto cuya temperatura es diferente de la del ambiente darán como resultado un error significativo. La causa más común de este problema es el tiempo necesario para que el objeto que se ha calentado regrese al temperatura ambiente. Los errores debidos a la diferencia de

temperatura tienen dos fuentes. Primero, las corrientes de convección dentro de la balanza ejercen un efecto de flotación sobre el platillo y el objeto. Segundo, el aire caliente atrapado en el recipiente cerrado pesa menos que el mismo volumen a menor temperatura <sup>[25]</sup>.

### **División de escala de la balanza**

Dependiendo del modelo de balanza usada, depende la división de la escala, es decir con cuantos decimales obtengo el valor de pesada en una determinada balanza, el último decimal en la escala es un decimal incierto, ésta será una fuente de incertidumbre en la medida, como también lo es el reporte de calibración llamado error máximo y la precisión de la balanza. Estas fuentes de incertidumbre deben ser calculadas y evaluadas de acuerdo a la ley de propagación de errores para encontrar la incertidumbre durante la pesada de una sustancia.

#### **1.6.1.2. Medición de un volumen.**

La medición precisa del volumen es tan importante para muchos métodos analíticos como la medición precisa de la masa. Existen en general dos clases de material volumétrico: De llenado *in*, volumen preciso en el interior del recipiente como en el caso de matraces aforados; y de volumen *ex*, volumen preciso una vez descargado el recipiente como en el caso de pipetas. El fabricante del material reporta las condiciones bajo las cuales se calibro el material y la tolerancia de la medida <sup>[36]</sup>.

### **Tolerancia del material volumétrico**

Son los límites de aceptación que se han elegido para un producto, esto depende de la capacidad de llenado.

### **Efecto de la temperatura sobre la medición del volumen.**

El volumen ocupado por una determinada masa de un líquido varía con la temperatura, lo mismo que sucede con el recipiente que contiene al líquido

durante la medición. La mayor parte de dispositivos para mediciones volumétricas se fabrica con vidrio, que tiene un pequeño coeficiente de expansión. En consecuencia, para el trabajo analítico no se debe tener presente como una fuente de incertidumbre en la medida.

Las mediciones volumétricas se deben referir a una temperatura estándar, este punto de referencia por lo general es de 20°C, por tanto se debe usar una corrección en la medidas de volumen medidos a temperaturas diferentes, dicho factor de corrección se describe en la ecuación 1.4.

$$\pm (V * \Delta T * Z) \quad (1.4)$$

En donde  $V$  es el volumen medido,  $\Delta T$  la diferencia entre la temperatura de calibración y la experimental y  $Z$  el factor de compresibilidad del agua <sup>[36]</sup>.

### 1.6.1.3. Durante una dilución

El factor de dilución normalmente se emplea cuando se miden elementos químicos en muestras de concentración de masa (mg/L) mayor al intervalo de trabajo del método. El factor de dilución se obtiene a partir de un proceso de dilución y pueden llevarse a cabo  $n$  diluciones de la muestra. El modelo matemático de una dilución está dado por la ecuación 1.5.

$$Fd_n = \frac{V_2}{V_1} \quad (1.5)$$

En donde,  $Fd_n$  es el factor de dilución  $n$ ,  $V_2$  es el volumen de aforo y  $V_1$  el volumen de la alícuota. En el proceso de una dilución se identifican dos fuentes de incertidumbre, el  $V_2$  de aforo y el  $V_1$  de la alícuota de la muestra. La estimación de incertidumbre estándar relativa del factor de dilución ( $UFd_n$ ), se realiza combinando las incertidumbres de ambas mediciones: volumen de la alícuota de muestra y volumen de aforo, de forma relativa y cuadrática, de acuerdo a la ecuación (1.6.) <sup>[37]</sup>

$$\frac{UFd_n}{Fd_n} = \sqrt{\left(\frac{UV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{UV_2}{V_2}\right)^2} \quad (1.6)$$

#### **1.6.1.4. Construcción de una curva de calibración**

Muchas metodologías necesitan la elaboración de una curva de calibración para la cuantificación del analito de interés, esta supone la elaboración de una serie consecutiva de patrones a los cuales se mide una propiedad (absorbancia, transmitancia, fluorescencia, etc.), el diseño experimental, supone una correlación lineal entre la concentración ( $\alpha$ ) y la propiedad medida ( $\gamma$ ). Dicha relación en la mayoría de las ocasiones es lineal y se describe mediante la ecuación 1.7.

$$\gamma = m\alpha + b \quad (1.7)$$

La construcción de esta curva de calibración y la interpolación de los patrones y muestra genera un valor de incertidumbre el cual debe ser combinado con la incertidumbre de la preparación de los patrones para evaluar la incertidumbre en la curva de calibración <sup>[37]</sup>.

#### **1.6.2. Evaluación de la incertidumbre.**

En esta etapa deben cuantificarse todas las fuentes de incertidumbre identificadas en la etapa anterior. Hay dos formas de cuantificar las fuentes de incertidumbre:

- a) Experimentalmente, es decir, haciendo replicados en el laboratorio. Tipo A
- b) Usando información disponible: certificados de calibración, tolerancias del material volumétrico, manuales de instrumentos, etc. Tipo B

Es importante señalar que todas las componentes de incertidumbre deben expresarse como incertidumbre estándar. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por  $\sqrt{3}$  el intervalo proporcionado por el fabricante (con lo que se asume que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular) <sup>[25]</sup>.

##### **1.6.2.1. Combinación**

Una vez que se han calculado todas las fuentes de incertidumbre, éstas deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene

una incertidumbre estándar combinada,  $U_c$ . El último paso, consiste en calcular la incertidumbre expandida,  $U$ . Para ello, debe multiplicarse la incertidumbre estándar por un factor de cobertura,  $k$ , ( $U=k \cdot u$ ). Normalmente,  $k$  es igual a 2. De esta forma, se obtiene un intervalo donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero <sup>[30]</sup>.

### **1.6.3. Expresión de la incertidumbre**

En informes de rutina es suficiente presentar el valor de la incertidumbre expandida. El resultado debe ir junto con la incertidumbre expandida  $U$ , como se indica a continuación <sup>[30]</sup>:

Resultado =  $X \pm U$  (unidades)

## **1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico tiene como objetivo identificar fuentes de error en un conjunto de datos; los errores pueden ser de dos tipos, aleatorios ó sistemáticos.

### **1.7.1. Errores aleatorios**

Los errores aleatorios o indeterminados se manifiestan cuando se efectúa una medición, y se deben a numerosas variables no controladas que son parte inevitable de toda medición física o química.

### **1.7.2. Errores sistemáticos**

Los errores sistemáticos tienen un valor definido, una causa conocida y una magnitud semejante a la que tienen las mediciones repetidas efectuadas en la misma forma. Estos errores dan lugar a una tendencia en la técnica de medición, tiene un signo y afecta por igual a todos los datos de un conjunto. Existen tres tipos de errores sistemáticos: Los que se deben al instrumento de medida, ya sea porque tiene pequeños defectos o por inestabilidad de sus componentes; los errores del método que surgen del comportamiento químico o físico no ideal de los

sistemas analíticos y los errores personales que se deben al mal manejo del analista por falta de precaución o experiencia.

### 1.7.3. Propagación de errores en los cálculos aritméticos

Con frecuencia es necesario estimar la desviación estándar de un resultado calculado a partir de dos o más datos experimentales, donde cada uno tiene una desviación estándar conocida. Como se muestra en la tabla 1.1. La forma de hacer estos estimados depende del tipo de operaciones aritméticas empleadas.

Tabla 1.1. Propagación de errores en los cálculos aritméticos

Tipo de cálculo	Ejemplo	Desviación estándar de y
Sumas y restas	$y = a + b - c$	$S_y = \sqrt{S_a^2 + S_b^2 + S_c^2}$
Multiplicaciones o divisiones	$y = \frac{(a \times b)}{c}$	$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2}$
Exponenciales	$y = a^x$	$\frac{S_y}{y} = x \frac{S_a}{a}$
Logaritmos	$y = \log_{10} a$	$S_y = 0.434 \frac{S_a}{a}$
Antilogaritmos	$y = \text{anti log}_{10} a$	$\frac{S_y}{y} = 2.303 S_a$

### 1.7.4. Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos. Los ejemplos de aplicación son múltiples, pudiéndose agrupar, según el objetivo que persiguen, en dos: la comparación de múltiples columnas de datos y la estimación de los componentes de variación de un proceso.

El análisis de varianza se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación. También se puede emplear en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria o factor. Las variaciones pueden ser controladas por el operador con el fin de diseñar experimentos intencionalmente que permitan identificar y evaluar las fuentes de variación en una metodología. Al variar un factor estamos hablando de un ANOVA de un factor, si se varían dos factores el ANOVA es de dos factores, y se mostrará si los resultados son significativamente diferentes al variar un factor.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. PREVALIDACION.

La etapa preliminar es parte integrante y pre-requisito; consiste en una serie de pasos que permiten obtener información relevante y orientar el proceso de la validación propiamente dicha. Antes de iniciar el proceso de validación se debe establecer por mediciones programadas los siguientes ítems.

#### 2.1.1. Verificación de patrones y reactivos

El proceso de validación requiere del uso de patrones de referencia con certificado de pureza o de incertidumbre, esto permite dar certeza a las medidas realizadas. En esta etapa se realizó la lista de reactivos y material de referencia certificado que se necesitó para la validación, teniendo en cuenta los siguientes aspectos

- ❖ Se identificaron y localizaron los reactivos necesarios en las metodologías.
- ❖ Se revisó la ficha técnica, esto con el fin de conocer la fecha de vencimiento, precauciones de manejo, pureza, cantidad y conservación del reactivo puro o en solución (si es el caso).
- ❖ Se identificaron los certificados de los patrones de referencia.

*Tabla 2.1. Listado de reactivos*

Hierro total	Hierro no hemo	Hierro hemo
Ácido clorhídrico	Acetato de sodio	Ácido clorhídrico
Agua destilada	Ácido clorhídrico concentrado	Agua destilada
Patrón de Hierro.	Ácido tricloroacético	Hidróxido de sodio
	Ácido tioglicónico	Metil isobutil cetona
	Agua destilada	Patrón de hierro hemo
	Batofenantrolina Bisulfatada	Éter dietílico
	Nitrito de sodio	
	Patrón de Hierro.	

### **2.1.2. Chequeo de procedimientos**

Para cada una de las metodologías se chequearon los procedimientos propuestos para validar e implementar.

#### **2.1.2.1. Hierro total**

Se siguió el procedimiento propuesto por la norma AOAC 968.88 para el análisis de minerales en alimentos concentrados. Como muestras de trabajo se usó pasta de chocolate fortificada con hemoglobina desecada al 5% y 30%.

#### **Principio.**

Una cantidad de muestra pesada, es sometida a calcinación para eliminar la materia orgánica, las cenizas son atacadas con ácido clorhídrico para extraer los minerales presentes, el líquido aforado es leído por absorción atómica y la absorbancia es interpolada en una curva de calibración.

El método utilizado se describe a continuación:

Se construyó una curva de calibración de hierro de 0-5 mg/L en HCl al 1%, ésta se usó para calcular la concentración de las muestras que junto con los patrones fueron procesados de la siguiente forma:

Se pesó la muestra en un crisol de porcelana, se sometió a calcinación en una mufla programada a 500 °C por 6 horas. Las cenizas frías se disolvieron en agua destilada y posteriormente se secaron en una estufa programada a 105 °C.

El residuo se atacó con ácido clorhídrico 1:1. Se sometió a digestión hasta leve sequedad. El residuo se calcinó en una mufla programada a 500 °C por 1 hora. Se adicionó más ácido clorhídrico concentrado al residuo frío. Se calentó hasta ebullición y se filtró en papel de filtro cualitativo. Se lavó tres veces con agua acidulada. Las aguas de filtrado se recogieron en un balón aforado de 100 mL y se completó el volumen con agua destilada, la absorbancia de las soluciones fue leída en un equipo de absorción atómica ajustado a las siguientes condiciones.

Tabla 2.1. Parámetros de trabajo para el espectrómetro y la llama

Parámetros Espectrómetro-Fe	Parámetros de llama
Longitud de onda: 248.3 nm	Llama: Aire-acetileno
Corrección de fondo: D <sub>2</sub>	Toma del nebulizador: 4 segundos
Tipo de señal: Continuo	Altura Mechero: 9.8 mm
Tiempo de medida: 1.5segundos	Flujo del combustible: 0.8L/min
Rendija: 0.2nm	

La absorbancia de las soluciones fue interpolada en una curva de calibración construida con patrones de hierro total.

#### 2.1.2.2. Hierro no hemo

El hierro no hemo se determinó por el método de *King et al.* (1990) usando como muestra de trabajo pasta de chocolate fortificada con hemoglobina desecada al 5% y 30%.

#### Principio.

La cuantificación de hierro no hemo consistió en una extracción sólido-líquido del hierro no hemo en medio ácido, el hierro es acomplejado con batofenantrolina formando un compuesto que absorbe radiación visible, posteriormente la absorbancia de luz visible es leída e interpolada en una curva de calibración.

El método utilizado se describe a continuación:

Se preparó una curva de calibración de hierro no hemo de 0 – 7 mg/L en HCl al 1%, ésta se usó para calcular la concentración de las muestras y patrones que fueron tratados de la siguiente forma:

Se pesó la muestra en un tubo de ensayo, usando una balanza analítica digital. Se diluyó con agua destilada, y se mezcló con 0.2 mL de una solución de NaNO<sub>2</sub> (0.39% peso/volumen), luego se incubó en presencia de 10 mL de una mezcla

ácida (1:1) de HCl 6 N y de ácido tricloracético del 40 % (peso/volumen) a 65° C por 20 horas, en un baño de calentamiento. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se transfirió la solución sobrenadante a un tubo de centrifuga y se adicionó el reactivo acomplejante (agua; solución saturada del acetato de sodio; batofenantrolina disulfonada, 0.162 %, en proporción 20:20:1 respectivamente). Se centrifugó por 15 minutos, inmediatamente se leyó la absorbancia a 537 nanómetros contra un blanco de muestra (1 mL de muestra + 5 mL del reactivo acomplejante, sin batofenantrolina), utilizando un espectrofotómetro. La concentración de hierro no hemo se determinó interpolando en una curva de calibración construida con patrones de hierro no hemo.

### **2.1.2.3. Hierro hemo**

La cuantificación de hierro hemo se realizó por el método de Oshima *et al.* (1997) usando como muestra de trabajo pasta de chocolate fortificada con hemoglobina desecada al 5% y 30%.

#### **Principio**

La determinación se basa en una extracción sólido-líquido por sonicación en metil isobutil cetona, los grupos hemo presentes en la muestra, son extraídos y cuantificados mediante la lectura de la absorbancia de radiación visible a la longitud de onda nominal del grupo hemo. La absorbancia es interpolada en una curva de calibración de hierro hemo.

El método utilizado en la técnica se describe a continuación:

Se preparó una curva de calibración de hierro hemo de 1 – 20 mg/L en NaOH al 4%, ésta se usó para calcular la concentración de las muestras que junto con los patrones fueron tratados de la siguiente forma:

Se pesó la muestra en un tubo de centrifuga utilizando una balanza analítica digital y se mezcló con agua destilada, metil isobutil cetona y ácido clorhídrico

concentrado. Se colocó la muestra en un baño ultrasónico por 10 minutos. Se adicionó 5 mL de agua destilada mezclando por 5 minutos, luego se centrifugó por 5 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a la longitud de onda nominal en un espectrofotómetro.

### **2.1.3. Mantenimiento de equipos**

Se realizó la lista de equipos usados en la validación a los cuales se les realizó el mantenimiento preventivo correspondiente, que garantizara óptimas condiciones de funcionamiento.

#### **2.1.3.1. Espectrofotómetro.**

El Laboratorio Químico de Consultas Industriales cuenta con un espectrofotómetro HACH DR 5000 verificado por la empresa ANDIA que por medio de sus servicios posventa realizó esta labor en el laboratorio

#### **2.1.3.2. Equipo de Absorción Atómica.**

Las medidas de absorción atómica se realizaron en un equipo THERMO ELECTRON modelo S4, al cual la empresa INNOVATEK realiza el mantenimiento preventivo.

#### **2.1.3.3. Equipos menores.**

En el desarrollo de las metodologías se usó un baño de calentamiento, una centrifuga, una manta de calentamiento, una mufla, una estufa y un baño ultrasónico, estos equipos no necesitan calibraciones para el uso previsto, sólo se verificó su correcto funcionamiento.

#### **2.1.3.4. Calibración de la balanza**

La empresa MetroCal Ltda. organización autorizada para realizar calibración de balanzas, verificó y calibró la balanza analítica con la expedición del correspondiente certificado de calibración.

#### **2.1.4. Verificación del material volumétrico**

Se realizó la lista del material volumétrico necesario para desarrollar las metodologías, identificando el material aforado que necesita ser verificado. El material se clasificó como de volumen *in* y de volumen *ex*. Antes de realizar cualquier ensayo se siguió el protocolo de lavado y secado del material.

##### **2.1.4.1. Protocolo de lavado y secado.**

Por tratarse de material usado para el análisis de metales se efectuó el siguiente protocolo de lavado y secado.

- ❖ Sumergir el material completamente en una solución de Genapol al 1 % por 2 horas.
- ❖ Enjuagar el material con abundante agua de la llave hasta retirar completamente la capa jabonosa.
- ❖ Enjuagar con solución de ácido nítrico al 1%.
- ❖ Enjuagar mínimo tres veces con agua destilada.
- ❖ Disponer el material en el área de secado, el material se debe escurrir y el secado debe ser por goteo. Para esto los balones se deben almacenar boca abajo, pipetas y buretas se deben almacenar en forma vertical.
- ❖ Una vez secado el material se debe guardar para protegerlo del polvo.

##### **2.1.4.2. Verificación de balones aforados.**

Este material se usó en la preparación de los patrones y en el aforo de las muestras procesadas. El material se verificó con el siguiente protocolo.

- ❖ Secar completamente el material a verificar.
- ❖ Pesar el recipiente a verificar.
- ❖ Determinar la temperatura del líquido de llenado (agua destilada).
- ❖ Llenar el recipiente con el líquido hasta que la parte inferior del menisco quede justo por encima de la marca del aforo.

- ❖ Pesar el recipiente a verificar con su carga.
- ❖ Determinar el peso de la carga por diferencia.
- ❖ Repetir el procedimiento mínimo tres veces.

#### **2.1.4.3. Verificación del material volumétrico ajustado por vaciado “EX”.**

Dentro de esta categoría se incluyó: bureta de 25 mL y pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL. Este material se verificó con el siguiente protocolo.

- ❖ Secar completamente un vaso de vidrio para almacenar la alícuota.
- ❖ Pesar el vaso.
- ❖ Determinar la temperatura del líquido de llenado (agua destilada).
- ❖ Llenar el recipiente a verificar con el líquido de llenado hasta que la parte inferior del menisco quede justo por encima de la marca del aforo.
- ❖ Secar la punta con un paño.
- ❖ Vaciar el recipiente a verificar dentro del vaso pesado. Colocando la punta inclinada sobre la pared del vaso y esperar 15 segundos hasta vaciar la última gota sin soplar.
- ❖ Pesar nuevamente el vaso con su carga.
- ❖ Determinar el peso de la carga por diferencia.
- ❖ Repetir el procedimiento mínimo tres veces.

#### **2.1.4.4. Cálculo del volumen**

Es necesario llevar los datos de masa obtenidos en las anteriores verificaciones a datos expresados en volumen. Esto se logra multiplicando la masa ( $W$ ) por un factor ( $Z$ ) dado en el anexo A, como se muestra en la ecuación 2.1. A cada conjunto de datos se le calculó la desviación estándar. Este valor nunca debe ser mayor al valor de tolerancia especificado por el fabricante de cada material, en caso contrario la verificación se debe repetir.

$$V_{20} = W \times Z \quad (2.1)$$

El valor de  $Z$  es escogido de acuerdo a la temperatura de trabajo (24°C)

## **2.2. VALIDACIÓN**

### **2.2.1. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro total en alimentos**

En este apartado se describe en forma detallada el procedimiento usado para el cálculo de las principales figuras de merito, como criterio de confianza en las metodologías.

#### **2.2.1.1. Curva de calibración**

Se midió 10 mL de un patrón de hierro de 1000 mg/L, se adicionó a un balón aforado de 100 mL que contenía 1 mL de HCl en un poco de agua destilada, se aforó con agua destilada hasta la marca del menisco. Esta solución de 100 mg/L de hierro se rotuló “solución madre”.

De la solución madre se midieron alícuotas de 0.5mL, 1mL, 2mL, 3mL, 4mL y 5 mL, que se aforaron a 100 mL con agua destilada en HCl al 1%, para preparar patrones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L respectivamente. Se preparó un blanco que contenía agua destilada al 1% en HCl. La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras y patrones.

#### **2.2.1.2. Intervalo de validación.**

Según la curva de calibración descrita anteriormente el intervalo de validación es de 0 a 5 mg/L. El manual del equipo de absorción atómica asegura linealidad dentro de este intervalo.

#### **2.2.1.3. Linealidad**

Se realizó la prueba de  $t$  de *student* a la recta de mínimos cuadrados para comprobar la linealidad de la curva dentro del rango de validación.

Fue necesario utilizar una prueba estadística adecuada para ver si el coeficiente de correlación era realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo. El método más simple fue calcular el valor  $t$  usando la ecuación:

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (2.2)$$

Donde  $r$  es el coeficiente de correlación y  $n$  el número de pares usados para calcular  $r$ . El valor calculado de  $t$  se compara con el tabulado al nivel de significación deseado, usando una prueba  $t$  de dos colas y  $(n-2)$  grados de libertad ver anexo B. La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre  $X$  y  $Y$ . Si el valor calculado de  $t$  es mayor que el tabulado la hipótesis nula se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa.

#### **2.2.1.4. Diseño experimental**

Se siguió el diseño propuesto por el Instituto Nacional de Salud expuesto en el curso-taller validación de métodos analíticos, organizado por el laboratorio de salud ambiental, dentro del programa: Vigilancia de la calidad del agua potable, metales y no metales de interés en salud pública.

En cada día de un total de 6 días que comprendió el ensayo, se analizaron en orden aleatorio las siguientes soluciones/muestras en un solo lote.

- ❖ 2 determinaciones testigo (BK<sub>1</sub>, BK<sub>2</sub>).
- ❖ 2 Soluciones estándares (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>).
- ❖ 2 Muestras naturales (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>).
- ❖ 2 Muestras adicionadas (M<sub>1</sub>+A<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>+A<sub>2</sub>)

#### **Descripción de soluciones y muestras.**

Solución testigo: Permitió la estimación del límite de detección y límite de cuantificación. Se preparó adicionando todos los reactivos a 1 mL de agua destilada y se sometió al mismo procedimiento analítico de las muestras.

Soluciones estándares: Se cubrió todo el rango de cuantificación del método, conociendo que el límite superior en concentración era de 5mg/L (C) se prepararon dos estándares; P<sub>1</sub> de 0.09C (0.45mg/L) y P<sub>2</sub> de 0.9C (4.5mg/L).

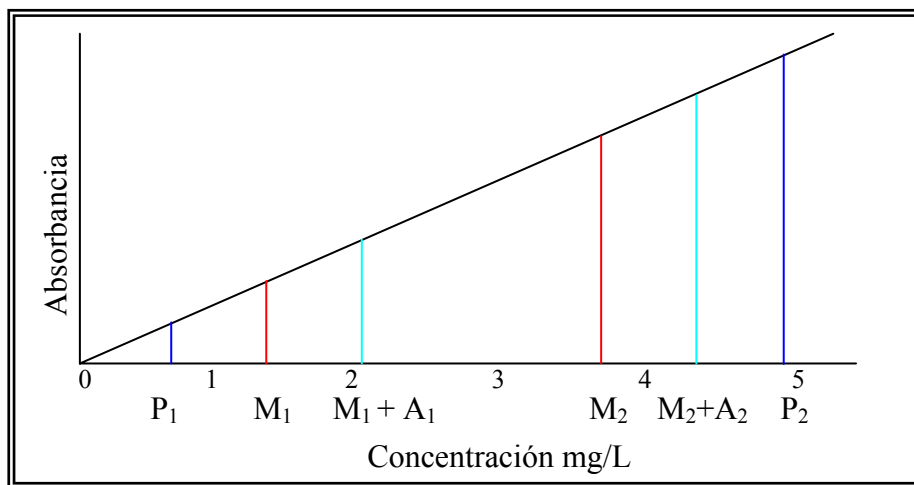
Muestras naturales: Permitieron estimar la precisión del método. Se escogió una muestra de pasta de chocolate fortificada con hemoglobina desecada en un 5 %

para  $M_1$  y en un 30% para  $M_2$ , en estas muestras la cantidad de hierro es función de la cantidad de hemoglobina adicionada. Para ubicar  $M_1 < 50\%$  del rango de validación, se pesó alrededor de 0.55g de  $M_1$  y para ubicar  $M_2 > 50\%$  del rango de validación se pesó alrededor de 0.33g de  $M_2$ .

Muestras adicionadas: Permitted estimar la exactitud del método. A la misma masa de  $M_1$  y  $M_2$  se adicionó el 0.033 mg y 0.077 mg de hierro respectivamente equivalentes a 0.33 mL y 0.77 mL de la solución madre.

El diseño pretende monitorear durante un intervalo de tiempo el comportamiento de las diversas soluciones, que idealmente se deben ubicar en rangos definidos. La figura 2.1 muestra la región en donde se deben ubicar las soluciones.

Figura 2.1. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración



### 2.2.1.5. El límite de detección

Con los datos de  $BK_1$  y  $BK_2$  se determinó el límite de detección calculando la desviación estándar y aplicando la ecuación 2.3

$$LD = \bar{X} + 3SD \quad (2.3)$$

Donde  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y  $SD$  es la desviación estándar de las medidas.

#### **2.2.1.6. El límite de cuantificación**

Con el valor medio y desviación estándar de las medidas usadas en el cálculo del límite de detección se calculó el límite de cuantificación utilizando la ecuación 2.4.

$$LC = \bar{X} + 10SD \quad (2.4)$$

Donde  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y SD es la desviación estándar.

#### **2.2.1.7. Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método se determinó mediante el cálculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados, construida en el rango lineal establecido anteriormente.

#### **2.2.1.8. Precisión**

Se estimó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido de  $M_1$  y  $M_2$ .

#### **2.2.1.9. Exactitud**

Se calculó el porcentaje de recuperación para los adicionados de alto y bajo rango.

### **2.2.2. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro no hemo en alimentos.**

En este apartado se describe en forma detallada la metodología usada para el cálculo de las principales figuras de mérito. Se determinó la longitud de onda nominal, la proporción analito acomplejante y estabilidad del complejo formado, como características metodológicas desconocidas siendo la primera vez que esta metodología se usa en el laboratorio.

#### **2.2.2.1. Determinación de la longitud de onda nominal**

Para determinar la longitud de onda nominal (longitud de onda de mayor absorción de radiación), se graficó el espectro de absorción de un patrón de 5 mg/L de hierro no hemo adicionado con solución acomplejante en el rango de 350 a 700 nm.

#### **2.2.2.2. Construcción de la curva de calibración**

Se prepararon patrones de hierro no hemo: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 13, 15, 18 mg/L (bajo las mismas condiciones en que se trataron las muestras). A 1 mL de cada patrón se adicionó 5 mL de solución acomplejante y se leyó la absorbancia a la longitud de onda nominal

#### **2.2.2.3. Determinación de la proporción analito acomplejante**

*King et al.* (1990) recomiendan mezclar 1 mL de muestra con 5 mL de solución acomplejante, sin embargo, se verificó dicha proporción (ya que es importante que la sustancia acomplejante se encuentre en exceso), para esto se tomó 1 mL del patrón de 7 mg/L de hierro no hemo (el patrón de mayor concentración en la curva de calibración) y se mezcló con volúmenes variables de solución acomplejante ( entre 1 y 7 mL ) aforando con mezcla ácida a 10 mL, para encontrar el punto en el cual la solución acomplejante se encuentra en exceso.

#### **2.2.2.4. Estabilidad del complejo**

Se mezcló 1 mL de un patrón de 3 mg/L de hierro no hemo, con 5 mL de solución acomplejante. Durante media hora se midió la absorbancia de la solución a la longitud de onda nominal, cada cinco minutos; para observar las variaciones en la absorbancia del complejo.

#### **2.2.2.5. Diseño experimental**

Se siguió el mismo procedimiento realizado en 2.2.1.4. De igual manera se determinó el límite de detección, el límite de cuantificación, la sensibilidad, la precisión y la exactitud.

#### **Descripción de soluciones y muestras.**

Blancos: BK1, BK2. Se prepararon adicionando todos los reactivos a 1 mL de agua destilada y se sometieron al mismo procedimiento analítico de las muestras.

Soluciones estándares: Límite superior de la curva 7 mg/L (C) se preparó P<sub>1</sub> de 0.09C (0.63 mg/L) y P<sub>2</sub> de 0.9C (6.3mg/L) a partir de la solución madre.

Muestras naturales: Se analizaron muestras de pasta de chocolate fortificada con hemoglobina desecada en un 30 % para M<sub>1</sub> y hemoglobina desecada para M<sub>2</sub>. Para ubicar M<sub>1</sub> < 50% del rango de validación, se pesó alrededor de 0.012g de M<sub>1</sub> y para ubicar M<sub>2</sub> >50% del rango de validación se pesó alrededor de 0.034g de M<sub>2</sub>.

Muestras adicionadas: A la misma masa de M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> se adicionaron 0.0052 mg y 0.0156 mg de hierro respectivamente, equivalentes a 0.52 mL y 1.56 mL de la solución madre, para construir los adicionados en un rango bajo y en un rango alto del método.

## **2.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR HIERRO HEMO EN ALIMENTOS**

### **2.3.1. Determinación de la longitud de onda nominal**

Para determinar la longitud de onda de mayor absorción de radiación o longitud de onda nominal, se leyó la absorbancia de un patrón de hierro hemo de 8 mg/L en el rango de 350 a 700 nm

### **2.3.2. Rango lineal**

Se prepararon patrones de hierro hemo de 0,0 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10, 16 y 20 mg/L (bajo las mismas condiciones en que se trataron las muestras). A cada patrón se leyó la absorbancia a la longitud de onda nominal y se construyó una gráfica de absorbancia versus concentración para determinar el rango lineal, es decir, se buscó el rango de concentraciones en donde existía correlación lineal.

### **2.3.3. Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método se determinó mediante el cálculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados, construida en el rango lineal establecido anteriormente.

#### **2.3.4. Límite de detección**

Para determinar el límite de detección se preparó un patrón de 0.02 mg/L de hierro hemo y se leyó la absorbancia 10 veces. El límite de detección se calculó con la ecuación 2.3.

#### **2.3.5. Límite de cuantificación**

Con el valor medio y desviación estándar de las medidas usadas en el cálculo del límite de detección se calculó el límite de cuantificación utilizando la ecuación 2.4.

#### **2.3.6. Análisis de muestras**

En una muestra de hemoglobina desecada se cuantificó el hierro hemo por triplicado, durante tres días. Se cuantificó la desviación estándar y los coeficientes de variación de las medidas de hierro hemo.

### **2.4. ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL.**

Se monitoreo diariamente la concentración de un patrón de hierro de concentración conocida durante un intervalo de 10 días, con ésta se elaboró la carta de control analítico identificando los límites de alarma y de acción.

### **2.5. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE.**

El cálculo de la incertidumbre se realizó para las técnicas validadas.

#### **2.5.1. Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.**

En cada una de las etapas de las metodologías se identificaron las fuentes de incertidumbre las cuales deben ser cuantificadas, combinadas y expandidas para lograr estimar la incertidumbre de la metodología.

#### **2.5.2. Incertidumbre en la determinación de hierro total en alimentos.**

Se identificaron las fuentes individuales de incertidumbre en la pesada, la dilución de muestra, la preparación de los patrones y la lectura de la curva de calibración.

Figura 2.2 Diagrama causa efecto para determinación de la incertidumbre (1)

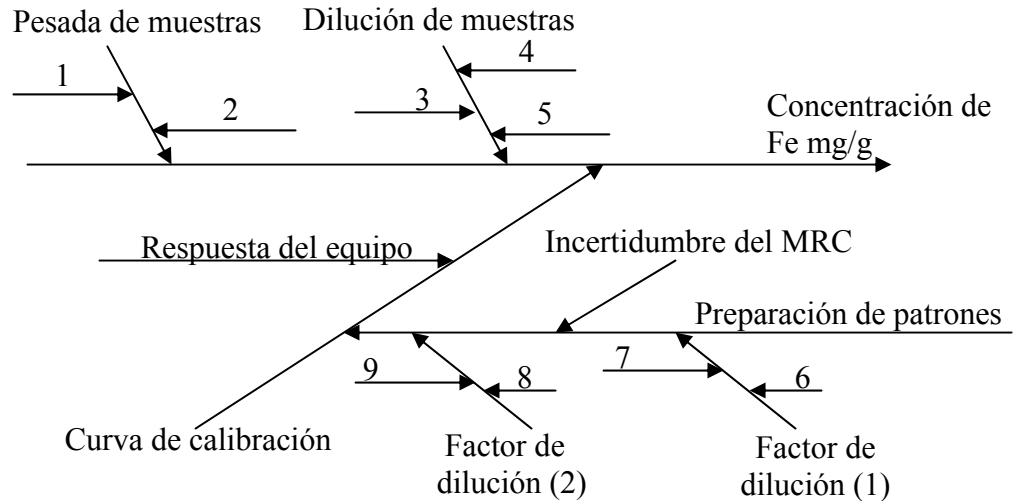


Tabla. 2.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre (1)

Pesada de las muestras	
1	Incertidumbre en la calibración de la balanza
2	División de la escala de la balanza
Dilución de las muestras en un balón aforado de 100 mL	
3	Repetibilidad del balón de 100 mL
4	Tolerancia del balón de 100 mL
5	Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y la del ambiente
Curva de calibración	
Factor de dilución (1) (preparación de la solución madre)	
6	Incertidumbre debida al uso de la pipeta de 10 mL
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
7	Incertidumbre debida al uso de un balón aforado de 100 mL
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad del balón
8	Incertidumbre debida al uso de una bureta de 25 mL
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la bureta
9	Incertidumbre debida al uso de un balón aforado de 100 mL
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad del balón
MRC usado en la preparación de los patrones de la curva	
Respuesta del equipo	

### 2.5.3. Incertidumbre en la determinación de hierro no hemo en alimentos

Al igual que para la determinación de hierro total por absorción atómica, en la determinación de hierro no hemo, se identificaron las fuentes de incertidumbre.

Figura 2.3. Diagrama causa efecto para la determinación de la incertidumbre (2)

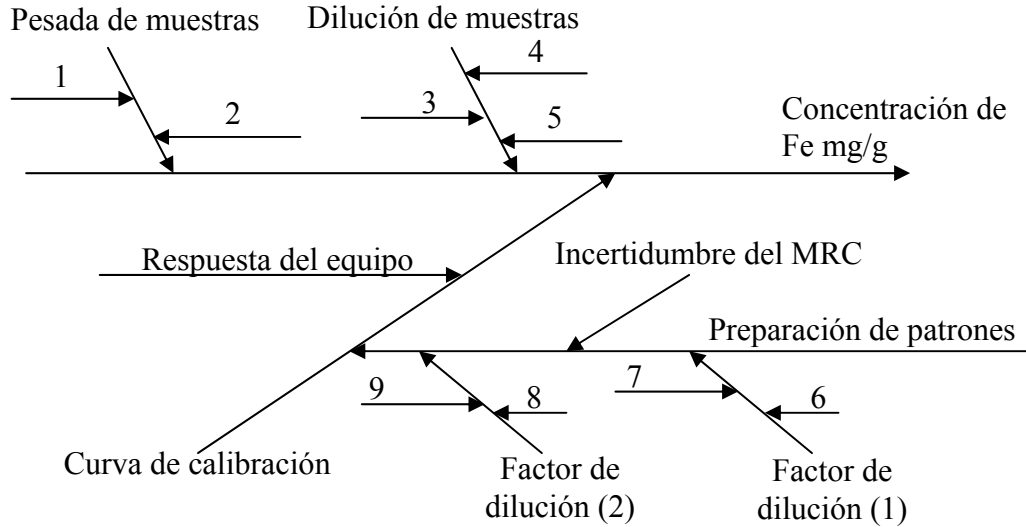


Tabla. 2.3. Identificación de las fuentes de incertidumbre (2)

Pesada de las muestras	
1	Incertidumbre en la calibración de la balanza
2	División de la escala de la balanza
Dilución de las muestras por adición de reactivos	
3	Adición de 10 mL de mezcla ácida (pipeta aforada de 10 mL) ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente ❖ Repetibilidad de la pipeta ❖ Tolerancia pipeta
4	Medición de muestra digerida ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente ❖ Repetibilidad de la pipeta ❖ Tolerancia pipeta
5	Adición de 5 mL de agente acomplejante (pipeta aforada de 5 mL) ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente ❖ Repetibilidad de la pipeta ❖ Tolerancia pipeta

Curva de calibración	
Preparación de patrones	
Primer factor de dilución (preparación de la solución madre)	
6	<p>Incertidumbre debida al uso de la pipeta de 10 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente</li> <li>❖ Repetibilidad de la pipeta</li> <li>❖ Tolerancia pipeta</li> </ul>
7	<p>Incertidumbre debida al uso de un balón aforado de 100 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente</li> <li>❖ Repetibilidad del balón</li> <li>❖ Tolerancia balón</li> </ul>
Segundo factor de dilución, preparación de patrones a partir de la solución madre.	
8	<p>Incertidumbre debida al uso de una bureta de 25 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente</li> <li>❖ Repetibilidad de la bureta</li> <li>❖ Tolerancia de la bureta</li> </ul>
9	<p>Incertidumbre debida al uso de un balón aforado de 100 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente</li> <li>❖ Repetibilidad del balón</li> <li>❖ Tolerancia balón</li> </ul>
Material de referencia usado en la preparación de los patrones de la curva	
Respuesta del equipo	

### **3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS**

#### **3.1. PREVALIDACIÓN**

##### **3.1.1. Verificación de patrones**

Para la validación de hierro total y hierro no hemo se usó un patrón de hierro Certipur 1000 ± 2mg/L. No: 1.19781.0500 MERCK Alemania. Los demás reactivos se especificaron en la metodología. La implementación del método para determinar hierro hemo en alimentos se desarrolló con un patrón de hierro hemo “hemin clorhidre” donado por la Universidad Nacional de Colombia.

##### **3.1.2. Mantenimiento de equipos**

###### **3.1.2.1. Absorción atómica**

El equipo de absorción atómica Thermo Electron fue verificado por la empresa INNOVATEK garantizando condiciones óptimas de funcionamiento.

###### **3.1.2.2. Espectrofotómetro**

El espectrofotómetro fue revisado por la empresa ANDIA la cual realizó el mantenimiento preventivo y garantizó condiciones óptimas de funcionamiento.

###### **3.1.2.3. Balanza**

La balanza fue calibrada por la empresa MetroCal Ltda. La cual emitió el respectivo reporte de calibración especificando el error del aparato y la incertidumbre de las medidas hechas por el equipo en la pesada.

##### **3.1.3. Verificación del material volumétrico**

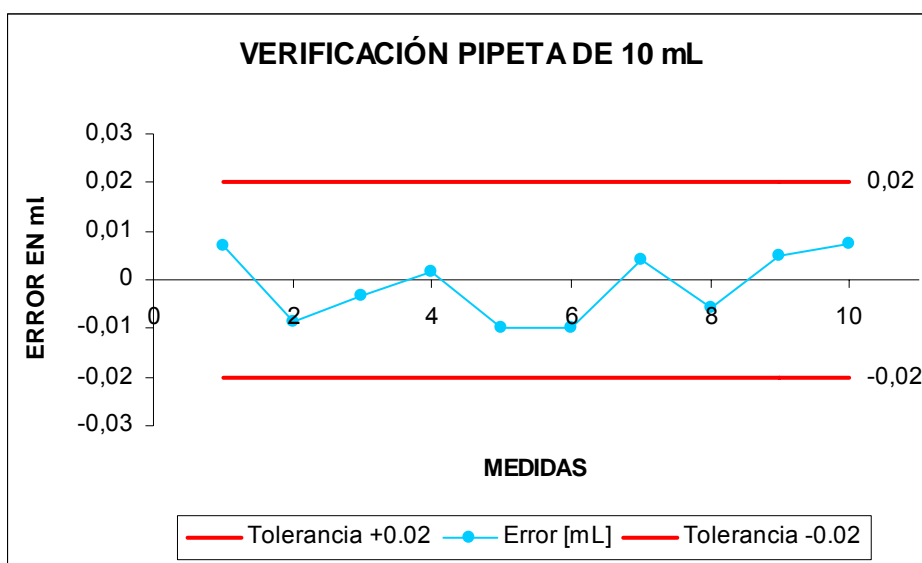
Para las metodologías se verificó el material con el cual se tomaron las alícuotas o se aforaron las diferentes muestras y patrones. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Verificación del material volumétrico

Medidas	Pipeta 1 mL	Pipeta 5 mL	Pipeta 10 mL	Bureta 25 mL	Balón 100 mL
1	1.0082	5.0123	10.0068	25.1943	99.9082
2	1.0058	5.0145	9.9913	25.1573	99.9371
3	1.0013	5.0023	9.9969	25.1665	99.9520
4	1.0111	5.0034	10.0016	25.2136	99.9397
5	1.0017	5.0156	9.9901	25.2256	99.9443
6	1.0057	5.0059	9.9902	25.1845	-----
7	1.0085	5.0245	10.004	25.2254	-----
8	1.0107	5.0156	9.9943	25.2358	-----
9	1.0048	5.0098	10.005	25.1927	-----
10	1.0011	5.0045	10.0076	25.1917	-----
s	0.0013	0.0070	0.0088	0.0260	0.0167
Tolerancia [mL]	±0.007	±0.015	±0.02	±0.05	±0.1

Los datos muestran que las medidas hechas con todo el material volumétrico de aforo se encuentran dentro del valor de tolerancia reportado por el fabricante. En la figura 3.1 se muestra en forma gráfica el error de la pipeta de 10 mL reportado en la tabla 3.1. Se observa un comportamiento sinusoidal de las medidas dentro del intervalo de tolerancia permitido.

Figura 3.1. Verificación de la pipeta de 10 mL



## 3.2 VALIDACIÓN

### 3.2.1. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro total en alimentos

#### 3.2.1.1. Curva de calibración

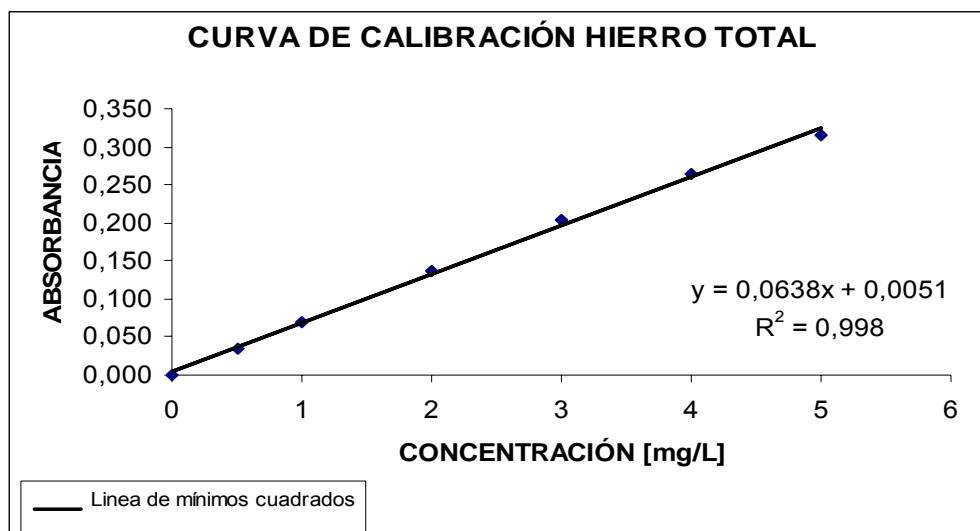
Durante los 6 días que duró el experimento se midieron los patrones de la curva de calibración. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración

Patrón [mg/L]	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
0	0	0.001	0	0	-0.001	0	0.000
0.5	0.035	0.035	0.032	0.033	0.042	0.032	0.035
1	0.071	0.071	0.066	0.065	0.086	0.064	0.071
2	0.138	0.138	0.13	0.126	0.168	0.124	0.137
3	0.203	0.203	0.192	0.187	0.245	0.188	0.203
4	0.265	0.265	0.252	0.244	0.313	0.244	0.264
5	0.316	0.316	0.305	0.294	0.372	0.293	0.316
r	0.9976	0.9979	0.9989	0.9987	0.9961	0.9983	0.999
m	0.0716	0.0639	0.0614	0.0593	0.0754	0.0593	0.0638
b	0.0053	0.0057	0.0036	0.0043	0.0081	0.0035	0.0051

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de hierro total mostrada en la figura 3.2.

Figura 3.2. Curva de calibración de hierro total



### 3.2.1.2. Intervalo de validación.

Se definió el intervalo de validación entre 0 mg/L y 5mg/L de hierro, apoyados en el estudio presentado en la tabla 3.2 en donde se observa un coeficiente de correlación de 0.999 para la curva construida con los promedios de los 6 días. Esto nos muestra una correlación lineal directa entre la concentración y la absorbancia en el rango evaluado.

### 3.2.1.3. Linealidad.

Se realizó la prueba  $t$  a la recta de mínimos cuadrados de la curva de calibración para verificar la linealidad en el intervalo de la curva.

Hipótesis nula: No existe correlación entre X y Y.

$t_{cal} = 35.30$       reemplazando en la ecuación 2.2 con  $n = 7$

$t_{tab} = 2.57$       Con un 95% de confianza y 5 grados de libertad.

Como  $t_{cal} > t_{tab}$  la hipótesis se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa entre X y Y.

### 3.2.1.4. Diseño experimental.

Se realizó la determinación de hierro total en las soluciones de trabajo durante 6 días. Los datos se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días

Concentración en mg/L					Concentración en mg/g			
Día	BK <sub>1</sub>	BK <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
Día1	0.002	0.003	0.397	4.589	0.156	1.090	0.215	1.343
Día 2	0.004	0.000	0.397	4.432	0.147	1.057	0.220	1.347
Día 3	0.002	0.003	0.487	4.506	0.165	1.106	0.223	1.298
Día 4	0.005	0.004	0.450	4.478	0.161	1.075	0.219	1.333
Día 5	0.002	0.004	0.496	4.538	0.171	1.119	0.215	1.340
Día 6	0.003	0.003	0.426	4.555	0.163	1.131	0.218	1.326
Media	0.003		0.442	4.516	0.161	1.097	0.218	1.331
Desvest	0.0013		0.043	0.056	0.008	0.028	0.0031	0.0179
%CV	44.96		9.759	1.250	5.134	2.546	1.409	1.343

Para las soluciones BK<sub>1</sub>, BK<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> el valor reportado corresponde a la concentración detectada por el equipo sobre las soluciones aforadas a 100 mL. Para las soluciones M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>+A<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>+A<sub>2</sub> el valor reportado corresponde a la concentración de hierro de la muestra de chocolate fortificado con hemoglobina desecada y sus adicionados. Los 6 lotes presentan bajas desviaciones estándar y bajos coeficientes de variación indicando una baja variabilidad en las medidas, se deduce que los datos obtenidos son uniformes y que la dispersión es baja. Esto se mostrara al evaluar la precisión y la exactitud de la metodología. La tabla muestra que las soluciones de más baja concentración (excepto los blancos) presentan %CV más altos indicando que el método es más sensible en la lectura de absorbancia de soluciones con concentración alta.

#### **3.2.1.5. El límite de detección**

El límite de detección se calculó con la ecuación 2.3 y las lecturas de los blancos reportados en la tabla 3.3.

$$LD = 0.003 + 3 * 0.0013 \quad LD = 0.007mg / L$$

#### **3.2.1.6. El límite de cuantificación**

El límite de cuantificación se calculó con la ecuación 2.4 y las lecturas de los blancos de la tabla 3.3.

$$LC = 0.003 + 10 * 0.0013 \quad LC = 0.02mg / L$$

#### **3.2.1.7. Sensibilidad del método.**

La tabla 3.2 muestra los valores de las pendientes de las rectas de mínimos cuadrados obtenidas de las lecturas realizadas durante los 6 días de la validación, la sensibilidad se estimó como el promedio de estas pendientes.

$$\text{Sensibilidad} = 0.06 \text{ mg/L}$$

Este valor indica que una variación en la concentración de 0.06 mg/L o más será detectada por el equipo y generará un valor de absorbancia diferente.

### 3.2.1.8. Precisión.

La precisión se evaluó en términos del porcentaje del coeficiente de variación para los patrones y las muestras analizadas en sectores bajos y altos del rango de validación. La tabla 3.3 muestra los %CV para los cuatro grupos de muestras analizados durante los 6 días.

Se observa que  $P_1$  y  $M_1$  presentan %CV más altos que  $P_2$  y  $M_2$ , esto nos indica que la técnica es más precisa para el análisis de soluciones ubicadas en sectores altos de la curva. Las soluciones ubicadas en el sector bajo de la curva podrán ser cuantificadas pero con una mayor variabilidad en la medida. En términos generales se acepta el valor del %CV reportado, puesto que se considera como aceptable %CV inferiores al 10 %, según la guía de validación, excepto en la lectura de los blancos en donde la variabilidad es muy alta.

### 3.2.1.9. Exactitud.

La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 3.3 muestra los valores de concentración en mg/g para cada uno de los adicionados, a continuación se muestran los cálculos realizados para evaluar el porcentaje de recuperación.

$$M_1 + A_1 \quad \%Rec.A_1 = \frac{mg\_de\_Fe\_detectados}{mg\_de\_Fe\_adicionados} \times 100$$

Como se indicó en 2.2.1.4.  $A_1 = 0.033$  mg que corresponde a los mg de Fe adicionados. Para calcular los mg de Fe detectados se restó  $(M_1 + A_1) - M_1$  obtenidos de la tabla 3.3.  $M_1$  se tomó como el promedio de todas las mediciones de  $M_1$ , el resultado se multiplica por la cantidad pesada que se muestra en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo

Día	Masa de muestra (g)	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	((M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub> )-0.161)*Masa (g)	%Rec.A <sub>1</sub> .
Día 1	0.5550	0.215	0.030	90.90
Día 2	0.5598	0.220	0.033	100.0
Día 3	0.5485	0.223	0.034	103.0
Día 4	0.5548	0.219	0.032	96.97
Día 5	0.5544	0.215	0.029	87.88
Día 6	0.5282	0.218	0.030	90.90
Promedio	-----	0.218	0.031	95.00

Se observa que el porcentaje de recuperación se encuentra en promedio en un 95%, este valor se acepta ya que los porcentajes de recuperación deben oscilar entre el 95% y el 105%. Como criterio de aceptación de la exactitud de un método, según la guía del Instituto Nacional de Salud.

$$M_2 + A_2 \quad \% \text{Rec.} A_2 = \frac{\text{mg\_de\_Fe\_detectados}}{\text{mg\_de\_Fe\_adicionados}} \times 100$$

De igual forma que para el adicionado A<sub>1</sub> en el cálculo del porcentaje de recuperación de A<sub>2</sub> debemos evaluar la cantidad del adicionado que fue recuperada por el método, los datos para el cálculo se muestran en la tabla 3.5. La cantidad adicionada de A<sub>2</sub> fue de 0.077.

Tabla 3.5. Cálculo del porcentaje de recuperación de a rango alto

Día	Masa de muestra (g)	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> (mg/g)	((M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> )-1.097)*Masa (g)	%Rec.A <sub>2</sub> .
Día 1	0.3311	1.343	0.081	105.2
Día 2	0.3410	1.347	0.085	110.4
Día 3	0.3367	1.298	0.068	88.3
Día 4	0.3345	1.333	0.079	102.6
Día 5	0.3328	1.340	0.081	105.2
Día 6	0.3367	1.326	0.077	100
Promedio	-----	1.331	0.078	102.0

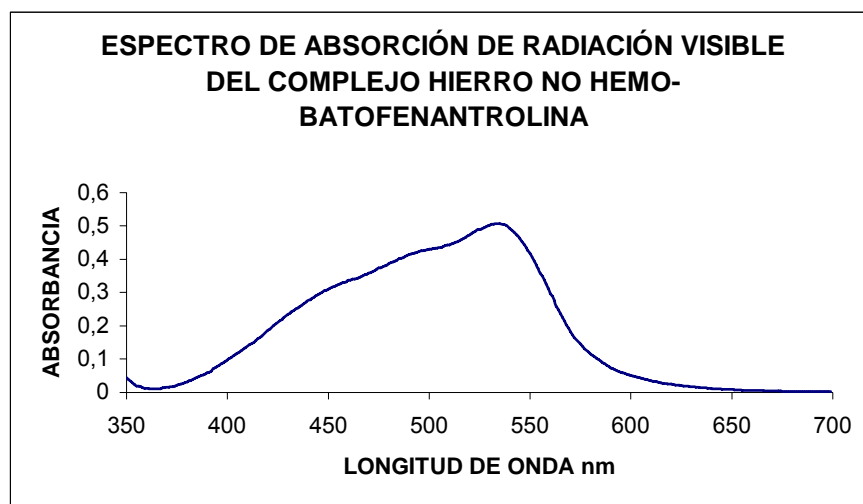
La tabla 3.5 muestra claramente que el método es muy exacto para la cuantificación de hierro a concentraciones altas. El porcentaje de recuperación fue mayor para las determinaciones realizadas a altas concentraciones señalando nuevamente que las muestra analizadas en el sector de alta concentración en la curva de calibración presentará una menor variabilidad en la medida y una mayor exactitud en el valor reportado.

### 3.2.2. Validación interna del método analítico para cuantificar hierro no hemo en alimentos.

#### 3.2.2.1. Longitud de onda nominal

En la figura 3.3 se muestra el espectro de absorción de radiación electromagnética de un patrón de 5 mg/L de hierro no hemo, en el rango de 350 a 700 nm. En la misma se observa que a 535 nm ocurre la mayor absorción de radiación electromagnética en la región visible, esta es la longitud de onda nominal para el complejo, todas las lecturas tomadas de este complejo (batofenantrolina-hierro no hemo) se realizaron a esta longitud de onda.

Figura 3.3. Espectro de absorción de radiación visible del complejo hierro no hemo-batofenantrolina



### 3.2.2.2. Curva de calibración

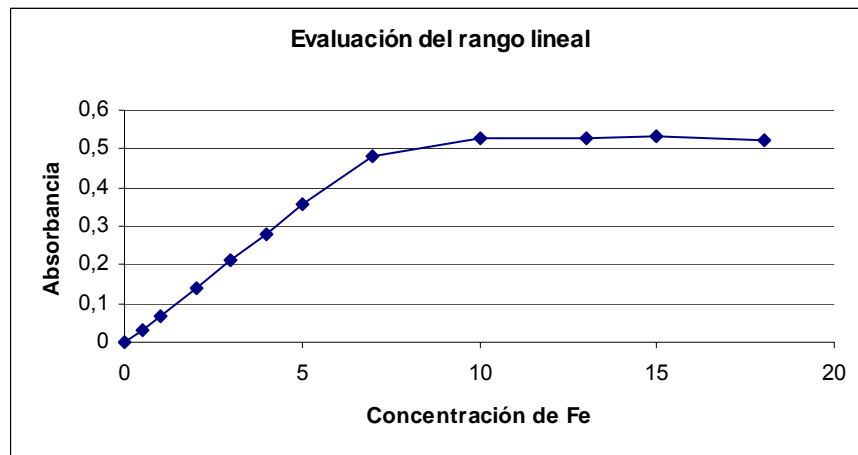
La tabla 3.6 muestra las lecturas de absorbancia de patrones de hierro no hemo acomplejado con batofenantrolina en un rango de concentración comprendido entre 0 y 18 mg/L, en donde se observa que el rango lineal del método, se encuentra entre 0 y 7.0 mg/L.

Tabla 3.6. Lecturas de absorbancia de patrones de hierro

Concentración de Fe	0	0.5	1	2	3	4
Absorbancia	0	0.033	0.067	0.142	0.21	0.277
Concentración de Fe	5	7	10	13	15	18
Absorbancia	0.355	0.481	0.526	0.529	0.531	0.522

Se graficaron los datos de la tabla 3.6 para observar claramente que a partir de una concentración aproximadamente de 8 mg/L la absorbancia del complejo formado es independiente de la concentración (ver figura 3.4), por esto se escogió como rango lineal el intervalo entre 0 mg/L y 7 mg/L.

Figura 3.4. Evaluación del rango lineal



### 3.2.2.3. Linealidad

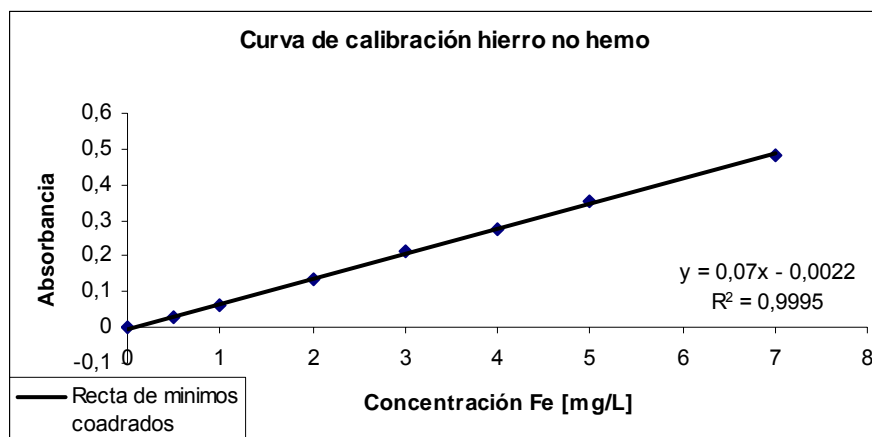
Se leyó la curva de calibración durante los días que duró el experimento, los datos se reportan en la tabla 3.7 y con el promedio de absorbancia de los patrones se construyó la curva de calibración del método.

Tabla 3.7. Lecturas diarias de los patrones de la curva de calibración

Patrón [mg/L]	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0.030	0.030	0.031	0.030	0.030	0.031	0.030
1	0.064	0.065	0.066	0.065	0.064	0.064	0.065
2	0.138	0.138	0.137	0.136	0.138	0.137	0.137
3	0.210	0.250	0.270	0.250	0.245	0.210	0.239
4	0.275	0.277	0.270	0.275	0.277	0.278	0.275
5	0.355	0.350	0.350	0.358	0.360	0.350	0.354
7	0.483	0.481	0.483	0.485	0.486	0.483	0.484
r	0.9976	0.9979	0.9989	0.9987	0.9961	0.9983	0.999
m	0.07	0.0695	0.0694	0.0705	0.0694	0.0693	0.07
b	0.0025	0.0023	0.0022	0.0024	0.0023	0.0021	0.0022

La figura 3.5 presenta la curva de calibración para hierro no hemo acompañado con batofenantrolina en el rango lineal escogido anteriormente. Se construyó la recta de mínimos cuadrados, esta posee un coeficiente de correlación de 0,9997.

Figura 3.5. Curva de calibración de hierro no hemo



Se realizó la prueba  $t$  a la recta de mínimos cuadrados de la curva de calibración para verificar la linealidad en el intervalo de la curva.

Hipótesis nula: No existe correlación entre X y Y.

$t_{cal} = 404.85$  reemplazando en la ecuación 2.2 con  $n = 8$

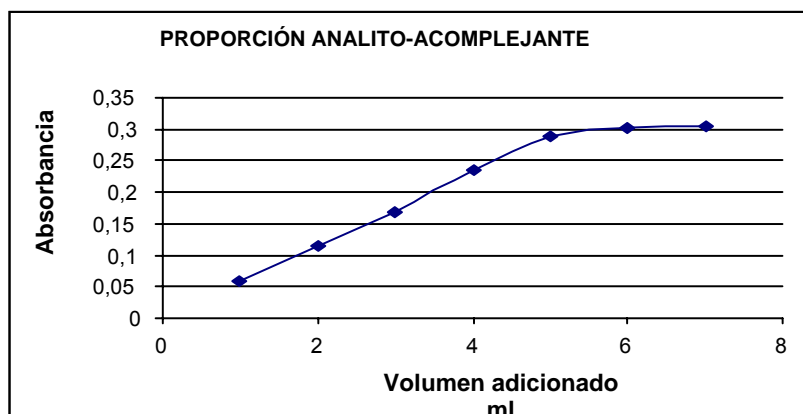
$t_{tab} = 2.45$  Con un 95% de confianza y 6 grados de libertad.

Como  $t_{cal} > t_{tab}$  la hipótesis se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa entre X y Y.

#### 3.2.2.4. Determinación de la proporción analito-acomplejante

La figura 3.6 muestra que aproximadamente en 5 mL de volumen adicionado de agente acomplejante, no se aprecia un aumento en la absorbancia de la solución preparada, esto indica que todo el hierro no hemo se ha consumido por el agente acomplejante y que en este volumen se encontrará en exceso cantidades apreciables de batofenantrolina.

Figura 3.6. Absorbancia de 1 mL de patrón de 7 mg/L de hierro no hemo con volúmenes variables de agente acomplejante.



#### 3.2.2.5. Estabilidad del complejo.

Como se observa en la tabla 3.8 no se presentan variaciones considerables de la absorbancia, en el tiempo, del complejo batofenantrolina-hierro no hemo, y se deduce además que la reacción entre estas dos sustancias es instantánea, esto permite estimar el tiempo en el cual se debe leer la absorbancia de las soluciones después de mezclados la batofenantrolina y el hierro hemo; el cual debe ser lo más rápido posible y antes de 25 minutos luego de haber realizado la mezcla, ya que dentro de este lapso de tiempo se obtiene la mayor absorbancia del complejo formado.

Tabla 3.8 Absorbancia del complejo Batofenantrolina-hierro no hemo en el tiempo.

Tiempo (min.)	Absorbancia
0	0.220
5	0.220
10	0.219
15	0.219
20	0.219
25	0.219
30	0.218

### 3.2.2.6. Diseño experimental

Se realizó la determinación de HNH en las soluciones de trabajo durante 6 días. Los datos se muestran en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Diseño experimental HNH

Concentración en mg/L					Concentración en mg/g			
Día	BK <sub>1</sub>	BK <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
Día1	0.030	0.027	0.650	6.670	0.94	1.78	1.373	2.069
Día 2	0.024	0.025	0.630	6.622	0.88	1.77	1.377	2.064
Día 3	0.024	0.030	0.625	6.634	0.95	1.74	1.375	2.050
Día 4	0.020	0.021	0.634	6.650	0.90	1.76	1.370	2.045
Día 5	0.022	0.024	0.626	6.610	0.92	1.75	1.372	2.040
Día 6	0.023	0.023	0.633	6.631	0.93	1.78	1.375	2.055
Media	0.024		0.633	6.636	0.920	1.763	1.378	2.0538
Desvest	0.003		0.009	0.021	0.026	0.016	0.011	0.0111
%CV	13.005		1.434	0.320	2.834	0.926	0.815	0.5417

### 3.2.2.7. El límite de detección

El límite de detección se calculó con la ecuación 2.3 y los valores de los blancos reportados en la tabla 3.9  $LD = 0.024 + 3 * 0.003$   $LD = 0.033mg / L$

### 3.2.2.8. El límite de cuantificación

El límite de cuantificación se calculó con la ecuación 2.4 y los datos de los blancos de la tabla 3.9.  $LC = 0.024 + 10 * 0.003$   $LC = 0.054mg / L$

Es necesario aclarar que las concentraciones de los límites de detección y cuantificación para las metodologías estudiadas se reportan en mg/L y no en mg/g ya que la detección y la cuantificación se realizan sobre los digeridos.

### **3.2.2.9. Sensibilidad del método.**

La sensibilidad se estimó como el promedio de las pendientes de las rectas de mínimos cuadrados obtenidas de las lecturas realizadas durante los 6 días de la validación, en la tabla 3.7 se muestran los datos obtenidos.

Sensibilidad = 0.07 mg/L

El valor de sensibilidad indica que una variación en la concentración de 0.07 mg/L o más será detectada por el equipo y generará una respuesta diferente.

### **3.2.2.10. Precisión.**

La precisión de la metodología se evaluó calculando el %CV de las muestras y patrones de bajo y alto rango. La tabla 3.9 muestra para  $M_1$ ,  $P_1$ ,  $M_2$  y  $P_2$  los siguientes valores 2.834, 1.434, 0.926, 0.320, de %CV respectivamente. Se observa una baja dispersión de los datos ya que todos los %CV no superan el 5% según la guía del Instituto Nacional de Salud estos valores son aceptados y la metodología se considera precisa para los fines previstos

### **3.2.2.11. Exactitud.**

La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 3.9 muestra los valores de concentración en mg/g para cada uno de los adicionados, a continuación se muestran los cálculos realizados para evaluar el porcentaje de recuperación.

$$M_1 + A_1 \quad \%Rec.A_1 = \frac{mg\_de\_Fe\_detectados}{mg\_de\_Fe\_adicionados} \times 100$$

$A_1 = 0.0052$  mg corresponde a los mg de Fe adicionados. Los mg de Fe detectados se obtuvo de.  $(M_1 + A_1) - M_1$ .  $M_1$  se tomó como el promedio de todas

las mediciones de  $M_1 = 0.92$ , el resultado se multiplica por la cantidad pesada para cada día mostrado en la tabla.

*Tabla 3.10. Porcentaje de recuperación de HNH a bajas concentraciones*

Día	Masa de muestra (g)	$M_1+A_1$ (mg/g)	$((M_1+A_1)-0.92)*Masa$ (g)	%Rec. $A_1$ .
Día 1	0.0124	1.373	0.0056	108.0
Día 2	0.0122	1.377	0.0056	107.2
Día 3	0.0125	1.375	0.0057	109.4
Día 4	0.0119	1.370	0.0053	103.0
Día 5	0.0123	1.372	0.0056	107.0
Día 6	0.0121	1.375	0.0055	105.9
Promedio	-----	1.378	0.0055	107.35

El porcentaje de recuperación se encuentra en promedio en 107.35%, este valor se acepta ya que no se encuentra muy alejado del rango óptimo 95% a 105%.

$M_2 + A_2$

Para  $A_2$  debemos calcular la cantidad del adicionado que fue recuperada por el método, los datos para el cálculo se muestran en la tabla 3.4.  $A_2$  para el caso fue de 0.0156 mg.

*Tabla 3.11. Porcentaje de recuperación de HNH a altas concentraciones*

Día	Masa de muestra (g)	$M_2+A_2$ (mg/g)	$((M_2+A_2)- 1.763)*Masa$ (g)	%Rec. $A_1$ .
Día 1	0.0521	2.069	0.0159	102
Día 2	0.0532	2.064	0.0138	103
Día3	0.0504	2.050	0.0145	92.7
Día 4	0.0543	2.045	0.0152	97.6
Día 5	0.0511	2.040	0.0142	90.7
Día 6	0.053	2.055	0.0155	99.36
Promedio	-----	2.0538	0.0150	97.56

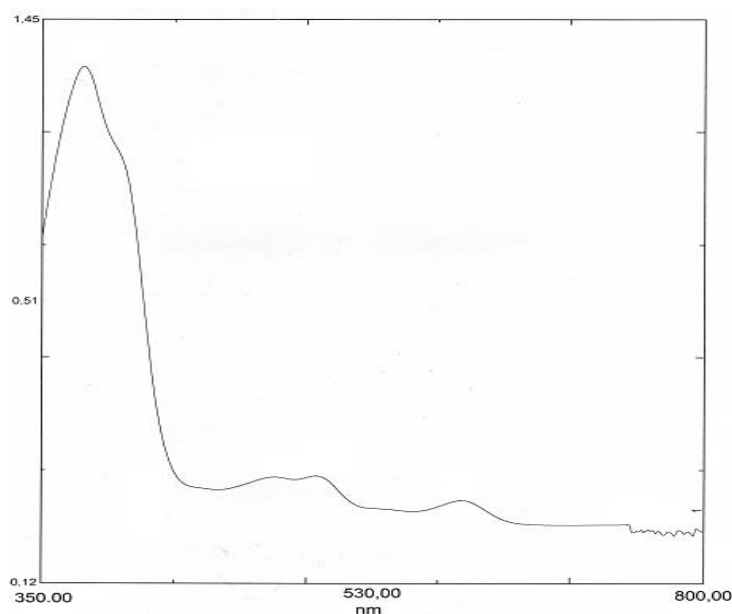
La metodología presenta un porcentaje de recuperación del 97 % para rangos altos de concentración, con esto se demuestra que la metodología es exacta.

### 3.3. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMO EN ALIMENTOS.

#### 3.3.1. Determinación de la longitud de onda nominal

La figura 3.6 muestra el espectro de absorción de radiación visible del patrón de hierro hemo de 8 mg/L, en el rango de 350 a 700 nm. Se observa que a 378.5 nm ocurre la mayor absorción de radiación para el hierro hemo. Este espectro coincide fielmente con el reportado en los trabajos de Oshima (1997).

Figura 3.7. Espectro de absorción de hierro hemo



#### 3.3.2. Construcción de la curva de calibración

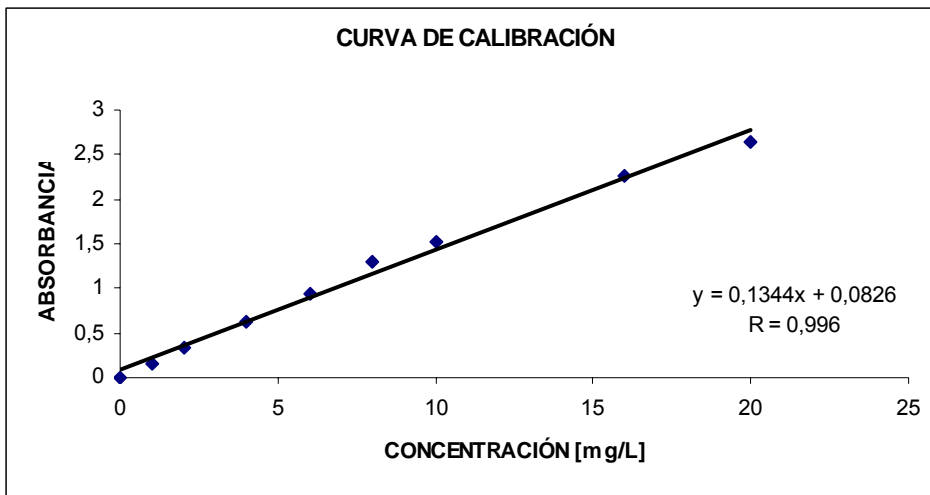
Con los resultados de absorbancia de cada patrón reportados en la tabla 3.11 se construyó la curva de calibración para hierro hemo que se observa en la fig. 3.7.

Tabla 3.12. Absorbancia de patrones de hierro hemo

Concentración de Fe	0	1	2	4	6
Absorbancia	0	0.155	0.328	0.626	0.931
Concentración de Fe	8	10	16	20	-----
Absorbancia	1.288	1.516	2.260	2.643	-----

El valor obtenido en el coeficiente de correlación ( $R=0.996$ ), muestra la dependencia lineal existente entre la absorbancia y la concentración de hierro hemo extraído de cada uno de los patrones preparados, es decir existe correlación lineal del método en el rango evaluado.

Figura 3.8. Curva de calibración de hierro hemo. Patrones leídos a 378.5 nm.



### 3.3.3. Sensibilidad del método.

La sensibilidad del método es de 0.134 mg/L. Valor tomado de la pendiente de la curva de calibración de la figura 3.7. Este valor muestra que una variación en la concentración de 0.134 mg/L genera un cambio detectable por el equipo en la absorbancia. En términos prácticos el método es capaz de diferenciar dos muestras diferentes sólo si sus concentraciones de análisis difieren en 0.134 mg/L o más.

### 3.3.4. Límite de detección

El límite de detección calculado del método fue de 0.033 mg/L. Para esta determinación se usó la ecuación 2.3 y los datos de la tabla 3.11 que muestra los valores de concentración para un patrón de 0.02 mg/L. Sólo concentraciones de análisis de hierro hemo superiores a 0.33 mg/L podrán ser detectadas por el equipo usando el método de estudio.

Tabla 3.13. Lecturas de un patrón de 0.02 mg/L de hierro hemo

CONCENTRACIÓN EN mg/L DETERMINADA	
	0,024
	0,026
	0,021
	0,021
	0,021
	0,024
	0,028
	0,021
	0,021
	0,028
<b>PROMEDIO</b>	0,0235
<b>DESVEST</b>	0,0030

### 3.3.5. Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación del método fue de 0.0535 mg/L en donde se aplicó la ecuación 2.4 y se usaron los valores de la tabla 3.11. Este dato indica que el método usado para cuantificar hierro hemo puede realizar determinaciones de hierro hemo superiores a 0.0535 mg/L, de otro modo se reportará el hierro hemo como detectado pero no cuantificado.

### 3.3.6. Determinación de hierro hemo en hemoglobina

El hierro hemo se cuantificó de la forma descrita en la metodología, por triplicado durante tres días, como una forma de evaluar la exactitud y precisión de la técnica. Los datos obtenidos se encuentran en la tabla 3.12.

Tabla 3.14. Concentración de hierro hemo en una muestra de hemoglobina

CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMO EN HEMOGLOBINA [mg/100g]			
	152,29	157	156,45
Día 1	155,31	Día 2 153,21	Día 3 155,34
	150,32	154,83	150,82
Promedio	152,64	155,92	153,6
Desvest	1,390	1,534	3,981
%CV	0,91	0,98	2,59

Los bajos coeficientes de variación obtenidos (0.91, 0.98, 2.59) para cada uno de los días, indican que el método es repetible durante los días de análisis y que la precisión es aceptable para las condiciones ya analizadas de la técnica puesto que el laboratorio acepta coeficientes de variación inferiores al 10%. La desviación estándar para las medidas de cada día, (1.390, 1.534, 3.981), muestra una dispersión baja de los datos, y por tanto que el análisis de las muestras no estará sujeto a errores sistemáticos generados por la aplicación de la técnica. Se calculó el coeficiente de variación para todas las mediciones (1.56) este dato muestra que la técnica es robusta siendo aplicada diferentes días bajo las mismas condiciones.

### **3.4. Determinación de la incertidumbre en la cuantificación de hierro total.**

#### **3.4.1. Pesada de las muestras.**

Se determinó la incertidumbre aportada al pesar las muestras. Se consideró dos fuentes de incertidumbre, la incertidumbre dada por la división de la escala de la balanza y la incertidumbre en la calibración de la balanza.

##### **3.4.1.1. Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza.**

La balanza usada muestra datos con 4 decimales, para la pesada, por tanto la incertidumbre estándar será: División= 0.0001g  $U1 = 0.0001/\sqrt{3} = 0.000058$

##### **3.4.1.2. Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza.**

El certificado de calibración de la balanza emitido por MetroCal presenta el siguiente valor de incertidumbre.

$U = 2E - 04 + 3.4E - 06w$  Donde  $w$  es el peso de muestra. Para la metodología se pesó alrededor de 0.55 gramos de muestra, por tanto la incertidumbre será:

$$U2 = (2E - 04 + 3.4 - 06 * 0.55) / \sqrt{3} = 0.00012$$

##### **3.4.1.3. Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras.**

$$Uc1 = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2} = \sqrt{(0.000058)^2 + (0.00012)^2} = 0.00013$$

#### **3.4.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras.**

La incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras esta dada por el cociente entre la incertidumbre combinada  $U_{c1}$  y el peso de muestra.

$$U_{ER1} = U_{c1} / 0.5500 = 0.00013 / 0.5500 = 0.00024$$

#### **3.4.2. Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 100 mL.**

Se tuvo en cuenta la incertidumbre dada por el efecto de la temperatura, la repetibilidad y tolerancia del balón de 100 mL.

##### **3.4.2.1. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.**

Esta contribución se obtiene multiplicando: la variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (100 mL) con una distribución rectangular

$$U3 = (4 * 2E - 4 * 100) / \sqrt{3} = 0.0462$$

##### **3.4.2.2. Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 100 mL.**

Esta incertidumbre se obtiene por la desviación estándar obtenida en la verificación del balón y asumiendo una distribución normal de los datos.

$$U4 = s / \sqrt{n} \text{ Donde n es el número de réplicas. } U4 = 0.0167 / \sqrt{5} = 0.0075$$

##### **3.4.2.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 100 mL**

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.1$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre esta dada por:

$$U5 = Tolerancia / \sqrt{3} = 0.1 / \sqrt{3} = 0.058$$

##### **3.4.2.4. Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.**

$$U_{c2} = \sqrt{(U3)^2 + (U4)^2 + (U5)^2} = \sqrt{(0.0462)^2 + (0.0075)^2 + (0.058)^2} = 0.0745$$

### **3.4.2.5. Incertidumbre Estándar Relativa por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.**

La incertidumbre estándar relativa esta dada por el cociente entre  $U_{c2}$  y el volumen de aforo (100mL).

$$U_{ER2} = U_{c2}/100 = 0.0745/100 = 0.000745$$

### **3.4.3. Incertidumbre debida al primer factor de dilución (Preparación de la solución madre en la curva de calibración).**

Como se mencionó en la metodología, para preparar los patrones de la curva de calibración primero se preparó una solución madre de 100 mg/L a partir del estándar certificado de 1000 mg/L midiendo 10 mL del estándar y aforando a 100 mL, para el cálculo de la incertidumbre se tiene en cuenta el aporte debido a la pipeta de 10 mL y al balón de 100 mL

#### **3.4.3.1. Incertidumbre generada por la pipeta de 10 mL (alícuota).**

Se tiene en cuenta el aporte de la repetibilidad de la medida de 10 mL, el efecto de la temperatura y la tolerancia de la pipeta.

##### **3.4.3.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta.**

En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen, asumiendo una distribución normal, la incertidumbre esta dada por:  $U_6 = s/\sqrt{n}$  Donde n es el número de medidas.

$$U_6 = 0.0088/\sqrt{10} = 0.0028$$

##### **3.4.3.1.2. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.**

Esta contribución se obtiene multiplicando: variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (10 mL) y una distribución rectangular.

$$U_7 = (4 * 2E - 4 * 10)/\sqrt{3} = 0.00462$$

#### **3.4.3.1.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 10 mL.**

El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.02$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre esta dada por:

$$U_8 = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.012$$

#### **3.4.3.1.4. Incertidumbre combinada de la pipeta de 10 mL.**

$$U_{c3} = \sqrt{(U_6)^2 + (U_7)^2 + (U_8)^2} = \sqrt{(0.0028)^2 + (0.00462)^2 + (0.012)^2} = 0.0132$$

#### **3.4.3.1.5. Incertidumbre Estándar Relativa de la pipeta de 10 mL.**

La incertidumbre estándar relativa esta dada por el cociente entre  $U_{c3}$  y el volumen de la pipeta (10 mL).

$$U_{ER3} = U_{c3} / 10 = 0.0132 / 10 = 0.00132$$

#### **3.4.3.2. Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)**

Esta incertidumbre ya fue calculada en el apartado 3.4.2.5. En donde se obtuvo el valor de la incertidumbre estándar relativa.  $U_{ER2} = 0.000745$

#### **3.4.3.3. Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución.**

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 10 mL ( $U_{ER3}$ ) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 100 mL ( $U_{ER2}$ )

$$U_{ER4} = \sqrt{(U_{ER3})^2 + (U_{ER2})^2} = \sqrt{(0.00132)^2 + (0.000745)^2} = 0.00152$$

#### **3.4.4. Incertidumbre debida al segundo factor de dilución (preparación de los patrones a partir de la solución madre)**

Ya con la solución madre preparada se prosigue a evaluar la incertidumbre generada durante el segundo factor de dilución, en donde a partir de la solución madre se tomaron las diversas alícuotas con una bureta de 25 mL y se aforaron en un balón de 100 mL para obtener los patrones de la concentración deseada.

#### **3.4.4.1. Incertidumbre generada por la bureta de 25 mL (alícuota)**

Se tienen en cuenta los tres aportes para el material volumétrico: Repetibilidad de la bureta, efecto de la temperatura y tolerancia de la bureta.

##### **3.4.4.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la bureta de 25 mL.**

En la verificación del material volumétrico se calculó la desviación estándar de 10 mediciones de volumen de la bureta de 25 mL, con la cual se calcula la incertidumbre estándar. Asumiendo una distribución normal de los datos.

$$U9 = s / \sqrt{n} \text{ Siendo } n \text{ el número de mediciones. } U9 = 0.026 / \sqrt{10} = 0.0082$$

##### **3.4.4.1.2. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.**

Esta contribución se obtiene multiplicando: variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (10 mL) y una distribución rectangular.

$$U10 = (4 * 2E - 4 * 25) / \sqrt{3} = 0.0115$$

##### **3.4.4.1.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la bureta de 25 mL.**

El fabricante de la bureta de 25 mL usada para la toma de las alícuotas reporta un valor de tolerancia de ±0.05 mL y se asume una distribución rectangular, por tanto lo incertidumbre esta dada por:

$$U11 = Tolerancia / \sqrt{3} = 0.05 / \sqrt{3} = 0.02887$$

##### **3.4.4.1.4. Incertidumbre combinada de la bureta de 25 mL.**

$$Uc4 = \sqrt{(U9)^2 + (U10)^2 + (U11)^2} = \sqrt{(0.0082)^2 + (0.0115)^2 + (0.02887)^2} = 0.03214$$

##### **3.4.4.1.5 Incertidumbre Estándar Relativa de la bureta de 25 mL.**

La incertidumbre estándar relativa esta dada por el cociente entre  $Uc4$  y el volumen de aforo (25 mL).

$$U_{ERS} = Uc4 / 25 = 0.03214 / 25 = 0.00129$$

#### **3.4.4.2. Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)**

Esta incertidumbre ya fue calculada en el apartado 3.4.2.5. En donde se obtuvo el valor de la incertidumbre estándar relativa.  $U_{ER2} = 0.000745$

#### **3.4.4.3. Incertidumbre estándar relativa del segundo factor de dilución.**

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la bureta de 25 mL ( $U_{ER3}$ ) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 100 mL ( $U_{ER2}$ )

$$U_{ER6} = \sqrt{(U_{ER5})^2 + (U_{ER2})^2} = \sqrt{(0.00129)^2 + (0.000745)^2} = 0.00149$$

#### **3.4.5. Incertidumbre Estándar debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.**

El material de referencia certificado tiene asociado un valor de incertidumbre relacionado con la concentración. El certificado reporta un valor de incertidumbre en la concentración de  $\pm 2$  mg/L. Asumiendo una distribución rectangular. La incertidumbre estándar estará dada por:

$$U_{12} = U \exp/\sqrt{3} = 2/\sqrt{3} = 1.1547$$

#### **3.4.5.1. Incertidumbre Estándar Relativa debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.**

La incertidumbre estándar relativa se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar por el valor de concentración del material de referencia certificado.

$$U_{ER7} = U_{12}/1000 = 0.00115$$

#### **3.4.6. Incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones usados en la curva de calibración.**

La incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución, del segundo factor de dilución y del material de referencia certificado.

$$U_{ER8} = \sqrt{(U_{ER4})^2 + (U_{ER6})^2 + (U_{ER7})^2} = \sqrt{(0.00152)^2 + (0.00149)^2 + (0.00115)^2} = 0.00242$$

**3.4.7. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.**

Para una ecuación de tipo  $\gamma = m\alpha + b$

Despejamos la componente que corresponde a la concentración como se muestra en la ecuación.

$\alpha$  = Concentración de masa

$\gamma$  = Respuesta del instrumento  $\alpha = \frac{(\gamma - b)}{m}$

b = La ordenada al origen

m = La pendiente calculada

En la tabla 3.13 se muestra un diseño típico experimental para la estimación de la incertidumbre, se realizó una curva de calibración con  $i$  concentraciones y  $j$  repeticiones con lo que se hace un arreglo  $\alpha_i, \gamma_j$ .

Tabla 3.15. Diseño experimental para la curva de calibración.

Curvas de calibración					
Concentración		$\gamma_1$	$\gamma_2$	.....	$\gamma_j$
	$\alpha_1$	$\alpha_1, \gamma_1$			
	$\alpha_2$				
	⋮				
	⋮				
	$\alpha_i$				$\alpha_i, \gamma_j$

Para este arreglo se realizó la regresión lineal y se calculó m y b, por medio de un ajuste de mínimos cuadrados.

Tenemos.  $m = 0.0638$  y  $b = 0.0052$

Con los datos obtenidos, para la elaboración de la ecuación de la línea recta en la curva de calibración, se estimó la incertidumbre, de una concentración de masa del elemento químico a medir “ $\alpha$ ”, con base al cálculo de regresión lineal de la curva de calibración con una respuesta “ $\gamma$ ”. Como se muestra en la ecuación.

$$U_{\gamma} = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\alpha - \bar{\alpha}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$$

$U_{\gamma}$	Incertidumbre del mensurado obtenida con el instrumento calibrado
$S$	Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal
$m$	Pendiente calculada
$p$	El número de réplicas de la muestra en estudio
$n$	Número de puntos en la curva de calibración, multiplicada por el número de réplicas "i*j".
$\alpha$	La concentración en estudio
$\bar{\alpha}_{MRC}$	Valor medio de las concentraciones en los patrones de la calibración
$S_{xx}$	Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones

Remplazando:

$$U_{13} = \frac{0.0059}{0.0638} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{42} + \frac{(3 - 2.214)^2}{20.93}} = 0.0434$$

La desviación estándar residual esta dada por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n - 2}} = 0.0059 \quad \text{y} \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (\alpha_i - \bar{\alpha})^2 = 20.93$$

Donde:

$\gamma_j$	Las $j$ lecturas observadas
$m\alpha + b$	Las $j$ lecturas ajustadas
$\alpha_i$	Las $i$ concentraciones usadas en la curva de calibración
$\bar{\alpha}$	Concentración media en la curva de calibración

El procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados asume que la incertidumbre de los valores de la abscisa son pequeños en comparación con los valores de la ordenada. Este procedimiento refleja la incertidumbre de los valores de absorbancia y no la incertidumbre de los estándares de calibración.

### 3.4.7.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración entre el valor de concentración de la medida, (3 mg/L)

$$U_{ER9} = U_{13} / 3 = 0.0434 / 3 = 0.01447$$

### 3.4.8. Incertidumbre Estándar Relativa debida a la curva de calibración.

La incertidumbre estándar relativa debida a la curva de calibración se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones y a la incertidumbre estándar relativa debida a la lectura de los patrones.

$$U_{ER10} = \sqrt{(U_{ER8})^2 + (U_{ER9})^2} = \sqrt{(0.00242)^2 + (0.01447)^2} = 0.01467$$

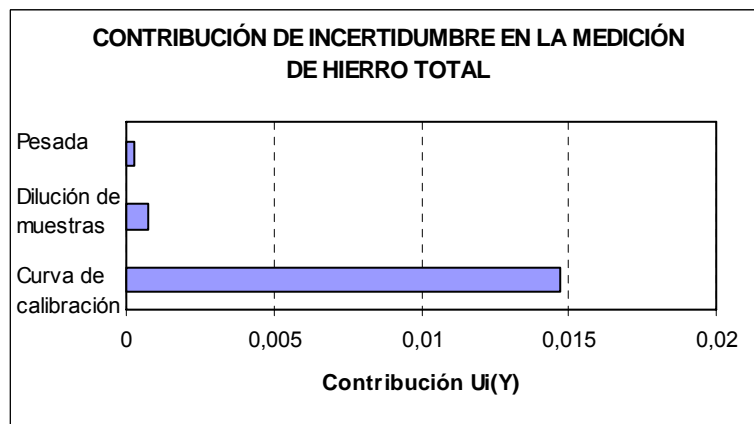
### 3.4.9. Incertidumbre combinada del método.

Esta se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

- ❖ Pesada de las muestras.
- ❖ Dilución de las muestras en un balón de 100 mL
- ❖ Respuesta del equipo.

$$U_{c\text{método}} = \sqrt{(U_{ER1})^2 + (U_{ER2})^2 + (U_{ER10})^2} = \sqrt{(0.00024)^2 + (0.000745)^2 + (0.01467)^2} = 0.0147$$

Figura 3.9. Contribución de incertidumbre en la medición de hierro total.



La curva de calibración hace la mayor contribución en incertidumbre a la metodología como se muestra en la figura 3.14, la pesada de las muestras hace una contribución insignificante al cálculo de la incertidumbre de la metodología.

#### **3.4.10. Incertidumbre expandida.**

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por k (el factor de cobertura).

$$U_{\text{exp met}} = \pm U_{\text{cdelmeétodo}} \times K = \pm 0.0147 \times 2 = \pm 0.0294$$

#### **3.4.11. Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito**

Se obtiene multiplicando la incertidumbre expandida por la concentración determinada en la metodología.

$$U = C \text{ mg / g} \times U_{\text{exp met}} \quad \text{En donde C es el valor de la concentración}$$

#### **3.4.12. Expresión del resultado**

Expresión del resultado:  $C \pm U$  mg/g.

### **3.5. Determinación de la incertidumbre en la cuantificación de HNH**

Se tomaron algunos valores de incertidumbre obtenidos del anterior capítulo.

#### **3.5.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la pesada de las muestras**

Esta contribución fue calculada en 3.4.1.4.

$$U_{ER1} = 0.00024$$

#### **3.5.2. Incertidumbre por adición de reactivos.**

##### **3.5.2.1. Incertidumbre por adición de 10 mL de mezcla ácida (pipeta de 10 mL)**

En el numeral 3.4.3.1.5 se estimó la incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 10 mL.

$$U_{ER2} = 0.00132$$

### **3.5.2.2. Incertidumbre por medición de 1 mL de muestra digerida (pipeta 1mL)**

Para esta contribución se tiene en cuenta la repetibilidad de la pipeta de 1mL, el efecto de la temperatura y la tolerancia de la pipeta. En la tabla 3.1 se encuentran los valores de desviación estándar y tolerancia.

#### **3.5.2.2.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 1mL.**

$U1 = s / \sqrt{n}$  Donde n es el número de medidas.

$$U1 = 0.0013 / \sqrt{10} = 0.000411$$

#### **3.5.2.2.2. Incertidumbre por efecto de la temperatura. (4°C)**

$$U2 = (4 * 2E - 4 * 1) / \sqrt{3} = 0.000462$$

#### **3.5.2.2.3. Incertidumbre por la tolerancia de la pipeta de 1 mL.**

$$U3 = 0.007 / \sqrt{3} = 0.00404$$

#### **3.5.2.2.4. Incertidumbre combinada de la pipeta de 1mL.**

$$Uc1 = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2 + (U3)^2} = \sqrt{(0.000411)^2 + (0.000462)^2 + (0.00404)^2} = 0.00409$$

#### **3.5.2.2.5. Incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 1 mL.**

$$IER3 = Uc1 / 1 = 0.00409$$

### **3.5.2.3. Incertidumbre por adición de 5 mL de mezcla ácida.**

Para esta contribución se tiene en cuenta la repetibilidad de la pipeta, el efecto de la temperatura y la tolerancia de la pipeta. En la tabla 3.1 se encuentran los valores de desviación estándar y tolerancia.

#### **3.5.2.3.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 5 mL.**

$U4 = s / \sqrt{n}$  Donde n es el número de medidas.

$$U1 = 0.007 / \sqrt{10} = 0.00221$$

### 3.5.2.3.2. Incertidumbre por efecto de la temperatura. (5°C)

$$U_5 = (4 * 2E - 4 * 5) / \sqrt{3} = 0.00231$$

### 3.5.2.3.3. Incertidumbre por la tolerancia de la pipeta de 5 mL.

$$U_6 = 0.015 / \sqrt{3} = 0.00866$$

### 3.5.2.3.4. Incertidumbre combinada de la pipeta de 5 mL.

$$U_{c2} = \sqrt{(U_4)^2 + (U_5)^2 + (U_6)^2} = \sqrt{(0.00221)^2 + (0.00231)^2 + (0.00866)^2} = 0.00923$$

### 3.5.2.3.5. Incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 5 mL.

$$U_{ER4} = U_{c2} / 5 = 0.001846$$

### 3.5.2.4. Incertidumbre estándar relativa debida a la dilución por adición de reactivos.

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de las pipetas de 10 mL, 1 mL y 5 mL.

$$U_{ER5} = \sqrt{(U_{ER2})^2 + (U_{ER3})^2 + (U_{ER4})^2} = \sqrt{(0.00132)^2 + (0.00409)^2 + (0.001846)^2} = 0.00468$$

### 3.5.3. Incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones usados en la curva de calibración.

La incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa: del primer factor de dilución calculada en el numeral 3.4.3.3, del segundo factor de dilución calculado en el numeral 3.4.4.3, y de la incertidumbre del material de referencia certificado calculada en el numeral 3.4.5.1..

$$U_{ER6} = \sqrt{(0.00152)^2 + (0.00149)^2 + (0.00115)^2} = 0.00242$$

### 3.5.4. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

El modelo del cálculo se mostró en el numeral 3.4.7.

$$U7 = \frac{0.00432}{0.0704} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{42} + \frac{(6 - 2.8125)^2}{40.97}} = 0.0406 \quad \text{Donde:}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n - 2}} = 0.00432 \quad \text{y} \quad S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2 = 20.93$$

#### 3.5.4.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración entre el valor de concentración de la medida, (6 mg/L)

$$U_{ER7} = U7 / 6 = 0.0406 / 6 = 0.0068$$

#### 3.5.5. Incertidumbre Estándar Relativa debida a la curva de calibración

La incertidumbre estándar relativa debida a la curva de calibración se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones y a la incertidumbre estándar relativa debida a la lectura de los patrones.

$$U_{ER8} = \sqrt{(U_{ER6})^2 + (U_{ER7})^2} = \sqrt{(0.00242)^2 + (0.0068)^2} = 0.00722$$

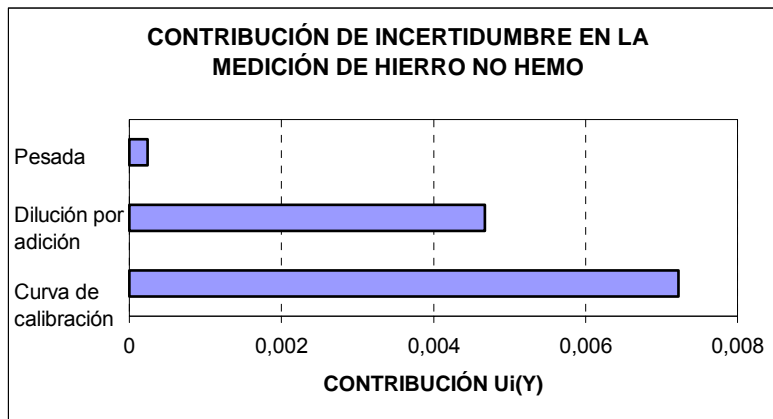
#### 3.5.6. Incertidumbre combinada del método.

Esta se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

- ❖ Pesada de las muestras.
- ❖ Dilución de las muestras por adición de reactivos
- ❖ Curva de calibración.

$$U_{c_{\text{método}}} = \sqrt{(IER1)^2 + (IER5)^2 + (IER8)^2} = \sqrt{(0.00024)^2 + (0.00468)^2 + (0.00722)^2} = 0.00861$$

Figura 3.10. Contribución de incertidumbre en la medición de hierro no hemo



En la figura se muestra las principales fuentes de incertidumbre y su contribución a la incertidumbre en la cuantificación de hierro no hemo. La mayor fuente de incertidumbre la aporta la curva de calibración. La pesada de la muestra es una fuente insignificante de incertidumbre para toda la metodología. La estimación de incertidumbre en la medición de hierro total por absorción atómica y hierro no hemo por espectroscopia visible se obtuvo del certificado del Material de Referencia utilizado para preparar la curva de calibración, del certificado de calibración de la balanza, del certificado de calibración del material volumétrico utilizado, (pipetas, buretas y balones) y de mediciones repetidas realizadas al material volumétrico clase A.

### 3.5.7. Incertidumbre expandida.

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por  $k$  el factor de cobertura.

$$U_{\text{exp met}} = \pm U_{\text{cdel método}} \times K = \pm 0.00861 \times 2 = \pm 0.02 \text{ mg / L}$$

### 3.5.8. Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

Se obtiene multiplicando la incertidumbre expandida por la concentración determinada en la metodología.

$$U = C \text{ mg / g} \times U_{\text{exp met}} \quad \text{En donde } C \text{ es el valor de la concentración}$$

### 3.5.9 Expresión del resultado

Expresión del resultado:  $C \pm U$  mg/g.

### 3.6. Carta de control analítico.

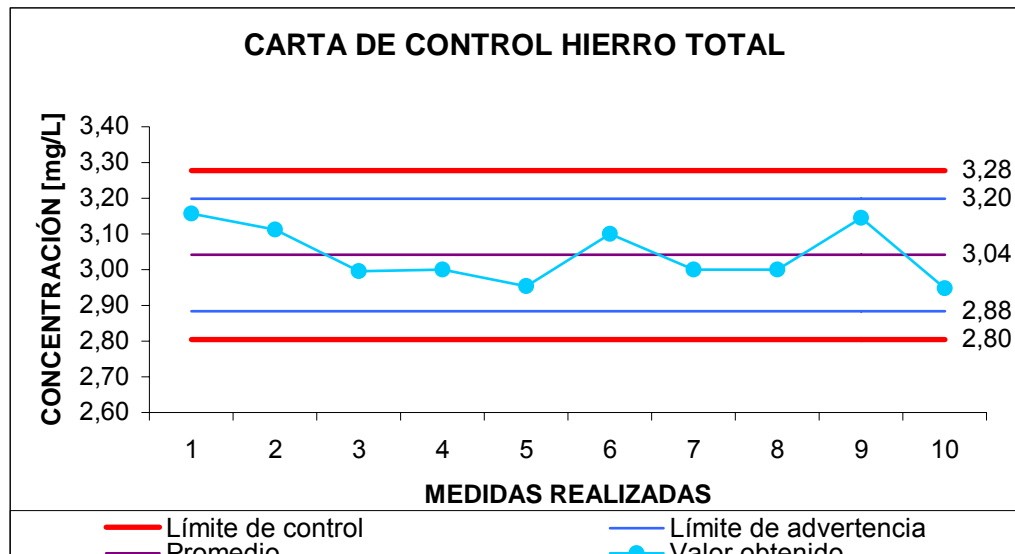
#### 3.6.1. Carta de control analítico de hierro total

Con las medidas realizadas a un patrón de 3 mg/L de hierro durante un intervalo de 10 días se elaboró la carta de control, los datos de encuentran en la tabla 3.16. La carta de control se muestra en la figura 3.11. En esta se observa un comportamiento aleatorio de las medidas sin ninguna tendencia, esto indica que la metodología no se encuentra sujeta a errores sistemáticos.

Tabla 3.16. Medida de la concentración de un patrón de 3 mg/L durante 10 días

Medida	1	2	3	4	5
Concentración de Fe	3.156	3.156	3.156	3.156	3.156
Medida	6	7	8	9	10
Concentración de Fe	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100

Figura 3.11. Carta de control analítico para la cuantificación de hierro total por absorción atómica.



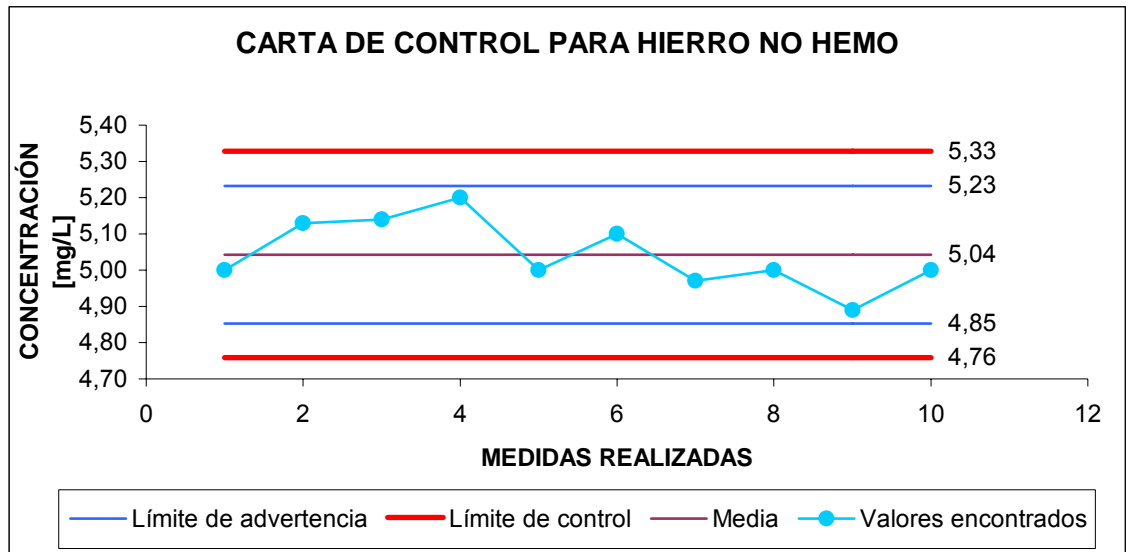
### 3.6.2. Carta de control analítico de hierro no hemo.

Se construyó la carta de control analítico (figura 3.12) para la cuantificación de hierro no hemo por espectrometría visible midiendo la concentración de un patrón de 5 mg/L de HNH. Los datos se muestran en la tabla 3.17.

Tabla 3.17. Datos de concentración de un patrón 5mg/L de hierro no hemo

Medida	1	2	3	4	5
Concentración de HNH	5.00	5.13	5.14	5,2	5.00
Medida	6	7	8	9	10
Concentración de HNH	5.10	4.97	5.0	4.89	5.0

Figura 3.12. Carta de control analítico para la cuantificación de hierro no hemo.



La figura 3.12 muestra que las mediciones oscilan dentro de los límites de advertencia de la metodología, el comportamiento es oscilatorio y no se presenta ninguna tendencia especial en las medidas esto muestra que la metodología no presenta errores sistemáticos y que los errores aleatorios se encuentran bajo control ya que ningún valor sobrepasa los límites de advertencia.

## CONCLUSIONES

La validación interna permitió cuantificar y evaluar experimentalmente las figuras de mérito que dan confianza a los métodos analíticos. El límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, incertidumbre y porcentaje de recuperación, permitieron demostrar que las metodologías pueden ser usadas por el Laboratorio Químico de Consultas Industriales.

En la evaluación de la linealidad del rango de validación escogido para las metodologías, se demostró la correlación lineal que existe entre la absorbancia y la concentración de analito en la muestra.

Las metodologías validadas poseen porcentajes de coeficiente de variación inferiores al 10% en el análisis de patrones y muestras, logrando clasificar a las dos técnicas como precisas para los fines previstos.

Se observó que los porcentajes de coeficientes de variación de las medidas aumentan significativamente al disminuir la concentración, esto nos indica que las muestras de baja concentración están sujetas a un mayor error en la cuantificación que las muestras de alta concentración.

Se mostró que los porcentajes de recuperación para las metodologías validadas son cercanos al 100 %, esto permite confiar en su exactitud. Este fue el criterio escogido para la exactitud, ya que no se cuenta con un patrón certificado trazable internacionalmente de hierro total y hierro no hemo en alimentos

Del cálculo de la incertidumbre de los dos métodos se puede concluir que la mayor fuente de incertidumbre en la cuantificación de hierro total y hierro no hemo está asociada a la construcción y lectura de la curva de calibración.

## RECOMENDACIONES

Para el desarrollo de futuros trabajos afines se recomienda seguir los siguientes aspectos:

Usar patrones certificados para la construcción de la curva de calibración.

Elaborar las curvas de calibración con el mayor cuidado posible ya que gran parte de la incertidumbre de las metodologías esta asociado a la construcción y lectura de la curva de calibración.

Seguir los protocolos de lavado del material volumétrico que se utilice en el desarrollo de las prácticas con el fin de evitar contaminación cruzada de las muestras y de los patrones.

Realizar el mantenimiento preventivo a todos los equipos de lectura de señales, para asegurar que los datos reportados por los equipos son confiables y no están sujetos a errores sistemáticos.

Llevar permanentemente la carta de control analítico para las metodologías, esto con el fin de mantener bajo supervisión el comportamiento de los métodos y de equipos involucrados en el análisis.

Extender los procesos de validación a las metodologías de cuantificación de otros bioelementos de interés.

## BIBLIOGRAFIA

1. BEARD, J. Piñero, D. Metabolismo del Hierro. Deficiencia de hierro. CESNI. Buenos Aires. Argentina. 1997;13-47.
2. BOCCIA, G. Martínez, B. Aguzzi, A. Rincón, F. Optimization of Heme Iron in raw and Cooked Red Meat. *Food Chemistry*, 2002; vol. 78, España, pp. 505-510.
3. BOCCIO, Jose. Salgueiro, Jimena. Lysionek, Alexis. Zubillaga, Marcela. Goldman, Cinthia. Weill, Ricardo y Caro, Ricardo. Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. 2003; vol. 53 No 2.
4. BOQUE, Ricard. El límite de detección de un método analítico. Universitat Rovira i Virgili Tarragona. España, 2001.
5. CASTILLO, B. Gonzáles, R. Protocolo de validación de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 1996; vol. 3, No 1, pp. 01-10.
6. Castro del Pozo S. Metabolismo del hierro normal y patológico. Ed 2. Masson. Barcelona. España. 1995.
7. CLARCK, E.M. Mahoney, A.W. Carpenter, C.E. Heme and Total Iron in Ready-to-Eat Chicken. *Journal Agriculture Food Chemical*, 1997; vol. 45, (American Chemical Society), pp. 124-126.
8. COLOMBIA. PRESIDENCIA DE LA REPUBLICA. Decreto 1994. Por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo y se establecen las condiciones de comercialización, rotulado, vigilancia y control. 28 de octubre de 1996.

9. CORONADO, A. Validación Interna del Método Analítico para la Determinación de Metanol en Bebidas Alcohólicas. 2005, Universidad Industrial de Santander, pp. 8-34.
10. COY, Gustavo Alfonso. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología y estudios ambientales. Programa de Físicoquímica ambiental. Bogotá. 1999.
11. DALLMAN, P. Iron Present knowledge in nutrition. Ed 6. International Life Sciences Institute. ILSI. North America. 1990.
12. DIAZ de Armas, Miriam, Oramas Hernández Idania, Cuervo Martínez de Santelices Marcia, Ma. Victoria Licea Tornés, Lidaila Gómez Bañobre, Gloria Louro González, Yelina Morera Fernández y Esther González Hernández. Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Revista Cubana de Farmacia*, 1998; vol 32 (2). pp 106-112.
13. EUROCHEM/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Chemistry. 2ed. U.S.A. S.L.R. ELLISON (LGC, UK) 2000.
14. FERNÁNDEZ H. Elementos de grupo VIII. Química general e inorgánica. Editorial Losada. Buenos Aires. Argentina. 1978.
15. HENAO, Luis Eduardo. Estandarización de un método espectrofotométrico. Instituto de hidrología metrología y estudios ambientales. Programa de físicoquímica ambiental. Bogotá. 1999
16. HORNSEY, H. C. The Color of Cooked Cured Pork, I. Estimation of the Nitric Oxide-Heme Pigments. *Journal of Science Food Agriculture*, 1956; vol. 7, pp. 534-540.

17. IDEAM. Protocolo estandarización de métodos analíticos, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios ambientales-IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental, 1999.

18. JAIMES, M. Estandarización y Validación de Algunos Parámetros Físico-Químicos en Suelos para uso Agrícola. 2005, Universidad Industrial de Santander, pp. 19-32.

19. JORDI RIU, Ricard Boqué; MAROTO ,Alicia y RIUS Xavier. EXACTITUD Y TRAZABILIDAD, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Instituto de Estudios Avanzados, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. España. 2001.

20. MANCERA, Luz Estella Y Cadena Camacho, Sandra Milena. Estandarización y validación de técnicas para el análisis de algunos parámetros fisicoquímicos del agua potable. Bucaramanga, 2002. Tesis de grado (Química) UIS. Escuela de Química.

21. KALPALATHIKA, P. V. Clark, E.M. Mahoney, A.W. Heme Iron Content in Selected Ready-to-Serve Beef Products. *Journal Agriculture Food Chemical*, 1991; vol. 39, (American Chemical Society), pp. 1091-19093.

22. KING, J. De Pablo, S. Montes de Oca, F. Nonheme Iron Evaluation of a Hemoglobin Iron Concentrate. *Journal of Food Science*, 1990; vol. 55, No. 2, pp. 594-595.

23. LEHNINGER, A. Nelson D, Cox M. Principles of biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York. USA. 1995.

24. MAROTO, Alicia; Et al. Estrategias para el Cálculo de la Incertidumbre, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España. 2001
25. MILLER, J.N. Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4<sup>a</sup> ed. 2002. Pearson Prentice may, pp. 77-106.
26. NTC-ISO/IEC 17025. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración, 2005, Bogota, pp. 13-23.
27. ORTIZ, J. Peñaranda, S. Palma, R. Pardo, D. Puentes, W. Quinto Curso-Taller Validación de Métodos Analíticos. *Programa Vigilancia de la Calidad del Agua Potable, Metales y no Metales de Interés de Salud Pública*, 2007, Bogota, pp. 9-39.
28. OSHIMA, H. Sano, Mitsuaki. Ushio, F. Kawamura, N. Yamada, S. Saito, I. Hayakawa, J. Spectrophotometric Method for Heme Iron Determination in Foods. *Journal Toxicologi Environ Healt*, 1997; vol. 43, (Pharmaceutical Society of Japan), Japon, pp. 237-242.
29. RHEE, K. S. Ziprin, Y. A. Modification of the Schricker Nonheme Iron Method to Minimize Pigments Effects for Red Meats. *Journal of Food Science*, 1987: vol 52, No 5, pp. 1174-1176.
30. RIVAS, H. Fernandez, P. Estimación de incertidumbre para Medición de Zn por Espectrofotometría de Absorción Atómica- Flama. *Simposio de Metrología 2006*. México. pp. 25-27.
31. RUIZ, Echeverria Jeimmy Liliana. Validación de prácticas y metodologías analíticas en el laboratorio de aguas de C.E.S. Según requisitos de la NTC

ISO/IEC 17025 para aseguramiento de la calidad analítica. Bucaramanga, 2008. trabajo de grado (Ingeniero Químico). UIS, Escuela de Ingeniería Química.

32. SADETTIN, T. Bochagan, A. Fehmi, Y. A note on the Total and Heme Iron Contents of Ready-to-eat Doner Kebabs. *Meat Science*, 2004; vol. 67, pp. 191-194.

33. SCHRICKER, B.R. Millar, D.D. Stouffer, J.R. Measurement and Content of Nonheme and Total Iron in Muscle. *Journal of Food Science*, 1982; vol. 47, pp. 740-743.

34. SKOOG, Douglas A, et al. Química Analítica. Ed 7. Mexico: Mc GRAW-HILL. pp 21-62, 565-613. 2007

35. TURHAN, S. Ustun, N.S. Altunkaynak, B. Effect of Cooking Methods on Total and Heme Iron Contents of Anchovy. *Food Chemistry*, 2004; vol. 88, pp169-172.

36. VILLAMIZAR, Maria Paula. Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales (CEIAM). Bucaramanga, 2008. Trabajo de grado (Químico). UIS, Escuela de Química.

37. WOLFGANG A. Schmid y Lazos Martínez, Rubén. Guía para Estimar la Incertidumbre de la Medición, Centro Nacional de Metrología - Cenam, México, Mayo de 2000.

## ANEXO A

**Volumen ocupado por 1.000g de agua pesada en aire contra pesas de acero inoxidable.\***

Temperatura, T, °C	Volumen, mL	
	En T	Corregida a 20°C
10	1.0013	1.0016
11	1.0014	1.0016
12	1.0015	1.0017
13	1.0016	1.0018
14	1.0018	1.0019
15	1.0019	1.0020
16	1.0021	1.0022
17	1.0022	1.0023
18	1.0024	1.0025
19	1.0026	1.0026
20	1.0028	1.0028
21	1.0030	1.0030
22	1.0033	1.0032
23	1.0035	1.0034
24	1.0037	1.0036
25	1.0040	1.0037
26	1.0043	1.0041
27	1.0045	1.0043
28	1.0048	1.0046
29	1.0055	1.0048
30	1.0054	1.0052

\* Se han aplicado correcciones por flotación (pesas de acero inoxidable)

## ANEXO B

**Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza**

gl	95%	gl	95%	gl	95%	gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∞	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

gl : grados de libertad