

**VALIDACIÓN INTERNA DEL METODO “DETERMINACIÓN DE HIERRO POR  
ABSORCIÓN ATOMICA EN HARINA DE TRIGO FORTIFICADA”**

**YEFFER ALBERTO CARDENAS GONZALEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2005**

**VALIDACIÓN INTERNA DEL METODO “DETERMINACIÓN DE HIERRO POR  
ABSORCIÓN ATOMICA EN HARINA DE TRIGO FORTIFICADA”**

**YEFFER ALBERTO CARDENAS GONZALEZ**  
Tesis de Grado

**DIRECTOR**  
**JOSE CARLOS GUTIERREZ**  
Químico, M.Sc.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**  
**BUCARAMANGA**  
2005

## AGRADECIMIENTOS

*A los doctores Jorge Gómez Duarte y Ricardo Flores, por hacer posible la realización del proyecto.*

*A mi director de Proyecto el profesor José Carlos Gutiérrez*

*A Manuel Roberto Pilonieta y Luis Martín Mendieta, por su orientación profesional y por entregarme su conocimiento sin egoísmo.*

*A mis amigos de siempre Alex, Ernesto, Carolina y Auriol por el cariño sincero, mas que amigos hermanos.*

*A María Fanny Cárdenas, mi segunda madre, por su respaldo y apoyo, pero sobre todo por sus lecciones de vida.*

*A Marlyn por su amor de hermana y por el sentimiento de amistad que nos une, siempre será mi niña.*

*A mis padres Alberto y Norbelly , por hacer de mi lo que soy, a ellos en especial dedico este triunfo, gracias mis viejos, por alimentar mi espíritu con sus enseñanzas, los quiero.*

*A Dios por su bondad .....*

## CONTENIDO

	Pág.
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	3
3. MARCO TEORICO	6
3.1 HARINA DE TRIGO	6
3.1.1 Generalidades	6
3.2 MARCO LEGAL	7
3.2.1 Reglamento de fortificación	7
3.3 FUNDAMENTOS DE ABSORCION ATOMICA	9
3.3.1 Interferencias químicas	9
3.3.2 Interferencias de ionizacion	11
3.3.3 Interferencias de matriz	11
3.4 VALIDACION	11
3.4.1 Alcance de los estudios de validacion	12
3.4.2 Requisitos de las características de funcionamiento	13
3.5 PRECISION	16
3.6 TRAZABILIDAD, EXACTITUD Y VERACIDAD	17

3.7 INCERTIDUMBRE	17
3.7.1 Estimación de la incertidumbre; Aproximaciones existentes	18
3.8 APROXIMACION PROPUESTA PARA EL CALCULO GLOBAL DE LA INCERTIDUMBRE	20
3.9 ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN	21
3.10 ASEGURAMIENTO DE LA VERACIDAD	21
3.10.1 Metodo de las adiciones estándar	21
3.10.2 Metodo de Youden. Sesgo constante	22
3.11 ANALISI DE LA VARIANZA.	23
4. DISEÑO METODOLOGICO	25
4.1 DETERMINACION DE HIERRO POR ABSORCION ATOMICA	25
4.1.1 Principio del metodo	25
4.1.2 Equipos y Materiales	25
4.1.3 Reactivos	26
4.1.4 Procedimiento	26
4.1.5 Extracción	27
4.1.6 Determinación	27
4.2 CALIBRACION DE BALANZA ANALÍTICA	29
4.3 PREVALIDACION	29
4.3.1 Intervalo lineal	29
4.3.2 Sensibilidad	29
4.3.3 Limite de detección	29

4.3.4 Limite de cuantificación	30
4.4 VALIDACION	30
4.4.1 Estudios de precisión	30
4.4.2 Verificación de la trazabilidad	33
4.4.2.1 Veracidad	33
4.4.2.2 Ensayo interlaboratorios	36
4.5 ESTIMACION DE LOS COMPONENTES DE LA INCERTIDUMBRE	37
4.5.1 Incertidumbre de la concentración encontrada	38
4.5.2 Incertidumbre de la recuperación	38
4.5.3 Incertidumbre del sesgo constante	40
4.6 RECOMENDACIONES	40
5. RESULTADOS Y ANALISIS	40
5.1 PREVALIDACION	40
5.1.1 Intervalo lineal	40
5.1.2 Sensibilidad	42
5.1.4 Limite de detección	43
5.1.4 Limite de cuantificación	44
5.2 VALIDACION	45
5.2.1 Estudios de precisión	45
5.2.1.1 Repetibilidad	47
5.2.1.2 Reproducibilidad	49
5.2.1 Veracidad	49
5.2.2.1 Sesgo proporcional	52

5.2.2.2 Sesgo constante	54
5.3 COMPONENTES DE LA INCERTIDUMBRE	54
5.3.1 Incertidumbre de la concentración encontrada	54
5.3.2 Incertidumbre de la recuperación	55
5.3.3 Incertidumbre del sesgo constante	55
5.3.4 Incertidumbre total	56
5.4 ENSAYO INTERLABORATORIOS	58
6 CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS	64

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Curva de Adiciones estándar para estudio del sesgo proporcional	24
<b>Figura 2.</b> Curva de Youden para estudio del sesgo constante	25
<b>Figura 3.</b> Diseño anidado-precisión	33
<b>Figura 4.</b> Diseño anidado para la estimación del sesgo proporcional	35
<b>Figura 5.</b> Diseño anidado para la estimación del sesgo constante.	37
<b>Figura 6.</b> Curva de calibración para determinar el intervalo lineal de hierro	43
<b>Figura 7.</b> Curva de Ringbom para determinar el intervalo lineal.	43
<b>Figura 8.</b> Curvas de calibración para el análisis de hierro en harina de trigo	45
<b>Figura 9.</b> Curva de Adiciones estándar para harina tipo domestico	53
<b>Figura 10.</b> Curva de Adiciones estándar para industrial.	53
<b>Figura 11.</b> CV para concentraciones encontradas en el método de Youden.	55
<b>Figura 12.</b> Curvas de Youden para el estudio del sesgo constante	56
<b>Figura 13.</b> Diagrama de barras para las fuentes de incertidumbre evaluadas.	59
<b>Figura 14.</b> Incertidumbre total para 3 niveles de concentración.	59

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Análisis de varianza ANOVA, para el diseño anidado-precisión	34
<b>Tabla 2.</b> Cálculo de las varianzas para el diseño anidado –Precisión. <sup>16</sup>	34
<b>Tabla 3.</b> Lecturas para las curvas de calibración iniciales.	42
<b>Tabla 4.</b> Lecturas de las curvas de calibración para el análisis de hierro.	44
<b>Tabla 5.</b> Lecturas para la determinación de LDI, LDM y LC	46
<b>Tabla 6.</b> Datos de repetibilidad para 1.0 ppm de hierro	48
<b>Tabla 7.</b> Datos de repetibilidad para 4.0 ppm de hierro.	48
<b>Tabla 8.</b> Prueba de la F para la repetibilidad a dos concentraciones	49
<b>Tabla 9.</b> Precisión Intermedia entre días (Reproducibilidad)	49
<b>Tabla 10.</b> Prueba de la F. Reproducibilidad a dos concentraciones	50
<b>Tabla 11.</b> Prueba de la repetibilidad y reproducibilidad	50
<b>Tabla 13.</b> Prueba de la t para una media y un estándar conocido.	52
<b>Tabla 14.</b> Prueba de la t para dos medias. (P = 0.05; Dos colas)	54
<b>Tabla 15.</b> Lecturas correspondientes al estudio del sesgo constante.	55
<b>Tabla 16.</b> Componentes principales de U(CE)	57
<b>Tabla 17.</b> Principales componentes de U(R)	57
<b>Tabla 18.</b> Principales componentes de U (CTE)	58
<b>Tabla 19.</b> Incertidumbre aportada por las principales fuentes evaluadas.	58
<b>Tabla 20.</b> Incertidumbre total para tres niveles de concentración.	59

## RESUMEN

### TITULO

VALIDACION INTERNA DEL METODO: “ DETERMINACION DE HIERRO POR ABSORCION ATOMICA EN HARINA DE TRIGO FORTIFICADA”\*

### AUTOR

Yeffer Alberto Cárdenas\*\*

### Palabras clave:

Hierro  
Validación  
Incertidumbre

### DESCRIPCIÓN:

El Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander, tiene dentro de sus funciones, controlar que se adicione los niveles adecuados de hierro a la harina de trigo que se comercia en el departamento de Santander, por tal motivo inició el proceso de validación para el análisis de hierro en este importante alimento, a fin de garantizar la calidad en sus resultados analíticos, ya que ellos son la base de sanciones disciplinarias (si así se requieren) a productores e industriales que comercian con este producto alimenticio.

Durante el proceso de validación hecho en el Laboratorio Departamental de Salud Pública, se determinaron las características del método: Intervalo lineal, Límite de detección, Límite de cuantificación, y sensibilidad del método; Además de la precisión y trazabilidad de sus resultados. La incertidumbre se estimó de forma global , aprovechando la información generada durante la validacion y siguiendo la propuesta hecha por Alicia Maroto, en su tesis doctoral.

La metodología propuesta para el proceso de validacion arrojó resultados satisfactorios demostrando la pertinencia del análisis de hierro por absorcion atómica en harina de trigo fortificada, bajo las condiciones particulares del laboratorio.

---

\* Tesis de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: José Carlos Gutiérrez

## ABSTRACT

### TITLE:

VALIDITY OF THE ANALYTIC METHOD FOR DETERMINING IRON ATOMIC ABSORPTION IN WHEAT FLOUR\*

### AUTHOR

Yeffer Alberto Cárdenas\*\*

### Key words:

Validity  
Uncertainty  
Iron

### DESCRIPTION

The Santander state public Health Laboratory has to guarantee that appropriate amounts of iron are added to commercial wheat flour. Therefore it is currently validating the analytical procedures as the results provided by the analysis technique will be the criteria to enforce disciplinary sanctions the flour.

To validate the experimental method the linear interval, the detection limit, the quantification limit, and sensibility were determined; as well as the precision and accuracy; The uncertainty was globally estimated, from the information generated during the validation process and from the suggestions made by Alicia Maroto in her doctoral thesis.

The proposed validation procedure was satisfactory and showed that the atomic absorption iron analysis in wheat flour is the best selection gives the laboratory conditions.

---

\* Graduate thesis

\*\* Faculty of Sciences, chemistry program, Adviser: Jose Carlos Gutierrez

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el trigo es el cereal más producido en el mundo, la mayor parte se destina a consumo humano, principalmente en América y el medio oriente. Su procesamiento a harina de trigo y de esta a pan, galletas, pasta y otros productos, convierten a este alimento en vehículo apropiado para suministrar micronutrientes a la humanidad. La deficiencia de estos micronutrientes especialmente del hierro, es un problema de salud pública que afecta a la población colombiana más vulnerable, los efectos funcionales de su deficiencia, son entre otros anemia, cansancio y retraso afectando principalmente a niños y mujeres en edad fértil y gestante, bajo estas condiciones Colombia se comprometió internacionalmente a erradicar dicho problema mediante la fortificación de la harina de trigo<sup>14</sup>.

En Santander, la Secretaria de Salud ejerce entre otras, la función de controlar dicha fortificación y en general garantizar la confiabilidad de los alimentos que consumen los santandereanos, en la actualidad el análisis de hierro en harina de trigo es una técnica no validada internamente por el laboratorio, esto no permite adelantar sanciones disciplinarias a aquellos productores y comerciantes de este alimento, sin temor a incurrir en equivocaciones.

La tesis tiene como objetivo validar el análisis de hierro por absorción atómica en harina de trigo fortificada, determinando principalmente la precisión, trazabilidad e incertidumbre de la técnica, con base en las recomendaciones hechas por la IUPAC y el CODEX ALIMENTARIUS, para la validación de métodos analíticos, utilizando la propuesta de *Maroto y col (2002)*, para el cálculo global de la incertidumbre. Al final se pretende conocer las ventajas y limitaciones que presenta el método, bajo las condiciones de trabajo rutinario del laboratorio, realizando principalmente un cálculo aproximado pero representativo de la incertidumbre con que se emiten los resultados, todo esto a

fin de hacer las recomendaciones pertinentes, para mejorar la calidad en el procedimiento analítico.

## 2. ANTECEDENTES

En todos los campos de análisis se necesitan métodos de análisis fiables, La comunidad internacional reconoce, que los laboratorios deben adoptar medidas adecuadas para asegurar que son capaces de proporcionar datos de la calidad exigida.<sup>1,7</sup> La norma ISO/IEC 17025 aborda los requisitos generales para demostrar la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo<sup>6</sup>, dentro de estos requisitos, La validación de los métodos analíticos, es un componente esencial de las medidas que debe aplicar un laboratorio para obtener datos analíticos fiables; La IUPAC ha elaborado algunas directrices para la validación de métodos de análisis por un solo laboratorio, estas directrices constituyen recomendaciones de mínimos sobre los procedimientos que deben aplicarse para asegurar la validación apropiada de métodos de análisis.<sup>1</sup>

Muchos analistas consideran que un método estándar o de referencia que ha sido validado por algún organismo que posee una cierta reputación, puede aplicarse directamente en su laboratorio; La validación del método ya realizada, se considera, erróneamente, una garantía suficiente para obtener resultados de calidad, se sabe que esto no es así, sin duda con ellos podemos alcanzar buenos resultados pero hace falta demostrar que funcionan en nuestro ámbito de trabajo.<sup>2,7</sup>

En algunos sectores, principalmente en el análisis de alimentos, la exigencia de disponer de métodos que han sido “validados plenamente” es una prescripción de ley. Se considera habitualmente que la validación “plena” de un método de análisis comprende un examen de las características del método en un estudio del funcionamiento del método entre laboratorios (conocido también como estudio en colaboración o ensayo en colaboración. Se han establecido protocolos aceptados internacionalmente para la validación “plena” de un

método de análisis mediante un ensayo en colaboración, entre los que destacan el Protocolo armonizado internacional y el procedimiento de la ISO<sup>1</sup>

En estos protocolos o normas se exigen, para la validación plena del método de análisis, la participación en el ensayo en colaboración de un número mínimo de laboratorios. Sin embargo, no siempre es práctico o necesario realizar una validación plena de los métodos de análisis. En estos casos, puede ser apropiado proceder a una “validación de métodos por un solo laboratorio”.<sup>1</sup>

Es más fácil comprobar si una hipótesis fiable presenta alguna desviación de importancia que “demostrar” que una determinada hipótesis es correcta. cuando una determinada técnica analítica (como el análisis mediante cromatografía en fase gaseosa o los métodos de digestión en medio ácido) se ha utilizado con éxito durante mucho tiempo, en diversos analitos y matrices, las comprobaciones para su validación consisten, justificadamente, en ensayos relativamente sencillos, como medida de precaución. Por el contrario, cuando la experiencia acumulada es escasa, el estudio de validación debe proporcionar pruebas concluyentes de que las hipótesis planteadas son válidas en los casos particulares objeto de estudio y generalmente se deberán estudiar todas las posibles circunstancias de forma pormenorizada. Por consiguiente, en cada caso específico, el grado de profundidad de los estudios de validación necesarios dependerá, en parte, de la experiencia acumulada sobre la técnica analítica en cuestión.<sup>1</sup>

Por tanto no necesariamente todos los parámetros que incluye la “validación” son aplicables para todos los casos. Por ejemplo, para validar

métodos que se aplicarán para matrices complejas o poco comunes, puede no ser de interés los aspectos de selectividad y especificidad, por cuanto quienes han desarrollado y/o homologado el método ya han hecho (en la mayoría de los casos) un trabajo exhaustivo acerca de las interferencias y la manera de eliminarlas.<sup>7</sup>

De acuerdo a la metodología adoptada por el INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS), la mínima cantidad de soluciones a analizar que conforman el diseño experimental son 48, distribuidas en seis (6) lotes, de ocho (8) soluciones cada uno. Si el analito es estable, todas las soluciones pueden prepararse el mismo día, que una vez codificadas en forma aleatoria debe entregarse un lote para ser procesado diariamente y en forma consecutiva por el analista. Si el analito no es estable, se realiza el mismo procedimiento, pero cada lote debe prepararse diariamente hasta completar el total de soluciones que conforman el set.<sup>3</sup>, según la norma ISO 5725 las soluciones de trabajo consistirán de un blanco, dos estándar bajo y alto, y 2 parejas de recuperación donde se utiliza necesariamente la matriz de análisis.<sup>27</sup>

Una de las hipótesis del ANOVA es que la variación incontrolada es aleatoria, no obstante en aquellas mediciones tomadas durante un periodo, la variación en un factor incontrolado puede producir una tendencia en los resultados, conduciendo a errores sistemáticos,<sup>10,25</sup> a fin de eliminar estos se aplica la aleatorización analizando cada lote de acuerdo al orden asignado.<sup>5,10,,27</sup>

Las características cuantitativas de interés en la validación de métodos son las relativas a la exactitud probable del resultado obtenido. Por lo tanto, se puede afirmar de forma general, que la validación de métodos consiste esencialmente en la estimación de la incertidumbre de la medición. No obstante, dado que la incertidumbre de la medición se utiliza cada vez más como indicador clave tanto de la aptitud para los fines como de la fiabilidad de los resultados, cada vez más profesionales de la química analítica acometerán la validación de las mediciones

para respaldar la estimación de la incertidumbre y algunos profesionales querrán hacerlo de forma inmediata.<sup>1,4</sup>

Una nueva propuesta, calcula la incertidumbre en forma global (Maroto y col 2002), El fundamento teórico de la nueva aproximación es consistente con la aproximación ISO ya que se cuantifican todas las fuentes de incertidumbre y se combinan siguiendo la ley de propagación de errores. La diferencia entre ambas aproximaciones es que la ISO cuantifica individualmente cada uno de los componentes de incertidumbre del procedimiento analítico mientras que la nueva aproximación calcula la incertidumbre globalmente aprovechando fundamentalmente la información obtenida durante el procedimiento de la validación y determinación de la trazabilidad<sup>4,16,23</sup>.

### **3 . MARCO TEORICO**

#### **3.1 HARINA DE TRIGO**

##### **3.1.1 Generalidades**

Se estima que en la región de las Américas, 94 millones de personas padecen de alguna forma de deficiencia de hierro (WHO, 1998). Esta situación demanda una atención urgente por parte de los gobiernos, el sector privado, las organizaciones civiles y la sociedad en general para que en un esfuerzo conjunto se trate de controlar y disminuir estos problemas.

La deficiencia de estos micronutrientes especialmente de hierro, es un problema grave de salud pública que afecta a la población colombiana más vulnerable, las consecuencias de esta deficiencia, no solo afectan la salud, sino también la capacidad de trabajo y desarrollo de la población. Los efectos funcionales de la deficiencia de hierro son entre otros anemia, cansancio físico, fatiga, retraso en el crecimiento y disminución en la capacidad de aprendizaje. Estudios realizados en el país han demostrado que la prevalencia de anemia por deficiencia de hierro se ha incrementado en las últimas décadas. En el último estudio a nivel

nacional (ISN-95), se determino que la prevalencia de anemia fue de 23 %, 22% y 46 % en niños menores de 5 años, mujeres con edad fértil y mujeres gestantes respectivamente<sup>14</sup>.

De acuerdo a compromisos internacionales adquiridos en la Cumbre Mundial de la Infancia (1990) y la Conferencia Internacional de Roma (1992), varios países, dentro de ellos Colombia, se comprometen a erradicar la deficiencia de hierro. Una de las estrategias para eliminar este problema es la fortificación de alimentos con este micronutriente, programa que ha sido implementado por los países de la subregión andina, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Colombia luego de la iniciativa de FEDEMOL para fortificar la harina de trigo en el país, implementa la fortificación de la harina de trigo con hierro, Vitamina B1, Vitamina B2, Niacina y Ácido Fólico, enmarcado en el decreto 1944 de octubre de 28 de 1996.<sup>14</sup>

La fortificación de harina de trigo con hierro ( y otros micronutrientes) es una intervención practica, por que no requiere alterar los hábitos alimenticios de las poblaciones, ni exige mayores ajustes en su economía. La existencia de un sistema de molienda bien establecido que permita la adición uniforme de hierro, sumado a un monitoreo por parte de los entes regulatórios pertinentes, hacen que la fortificación con hierro en harina sea un arma segura para prevenir pero no curar la anemia por deficiencia de hierro.<sup>8</sup>

### **3.2 MARCO LEGAL**

El presidente de la república de Colombia, en ejercicio de sus atribuciones constitucionales y legales y en especial las que le confiere el numeral 11 del articulo 189 de la constitución política y la ley 09 de 1979

#### **DECRETA**

#### **Decreto 1994 del 28 de octubre de 1996**

*Por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo y se establecen las condiciones de comercialización, rotulado, vigilancia y control.*

### 3.2.1 Reglamento de fortificación de la harina de trigo para consumo humano en Colombia

ARTICULO 1º .-CAMPO DE APLICACIÓN.- Las disposiciones del presente reglamento se aplican a la harina de trigo que se comercializa en el territorio nacional para la venta directa al consumidor, como para la fabricación de productos de panadería, pastelería, galletería, pastas alimenticias y otros.

ARTICULO 2º .-OBLIGATORIEDAD DE FORTIFICACIÓN.- La harina de trigo que se comercializa en el territorio Nacional deberá estar fortificada con vitamina B1, Vitamina B2, Niacina, Ácido Fólico y hierro.

ARTICULO 4. REQUISITOS. La harina de trigo que se comercializa en el territorio nacional deberá estar adicionada o añadida con las siguientes cantidades mínimas de micronutrientes por cada kilogramo de harina.

Tabla 1. Micronutrientes adicionados a la harina de trigo.

<b>MICRONUTRIENTES</b>	<b>CANTIDAD MINIMA mg/kg</b>
Vitamina B1 o Tiamina	6 mg
Vitamina B2 o Riboflavina	4 mg
Niacina	55 mg
Hierro	44 mg

ARTICULO 10. VIGILANCIA Y CONTROL. El control y la vigilancia en el cumplimiento de las disposiciones contenidas en el presente decreto para harina de trigo fortificada y de las premezclas, estará a cargo del instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos -INVIMA- y las entidades territoriales competentes. Se tomarán periódicamente muestras de harina de trigo y de las premezclas para su análisis por parte del INVIMA.<sup>14</sup>

### **3.3 FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN ATOMICA**

La aplicación analítica de la absorción atómica, tiene su fundamento en la fuerte absorción que presentan algunos átomos a longitudes de onda características, que coincide con las líneas del espectro de emisión del metal.

El elemento de interés en la muestra debe estar en estado disociado, no excitado, no ionizado y en su estado de mínima energía, en estas condiciones el elemento es capaz de absorber radiación electromagnética en líneas discretas; las mismas que emitiría si fuese excitado; En las condiciones de equilibrio termodinámico y con cierta temperatura de la llama, el numero de átomos en los niveles excitados es prácticamente despreciable frente al numero de los que se hallan en el nivel fundamental, por tanto la emisión debida a los átomos en el nivel excitado, se debe a una pequeñísima fracción de los que se hallan en la llama y depende en gran parte de la temperatura de esta.

La relación entre la intensidad de la radiación electromagnética de una longitud de onda dada transmitida a través de un vapor atómico y la concentración de átomos capaces de absorber, esta dada por la ley de Beer.

Esta ley es de fundamental importancia cuando se consideran aspectos cuantitativos en los procesos de absorción atómica.

$$A = a \cdot b \cdot [ ]$$

De esta manera la ley de Beer establece una relación lineal entre la concentración y la absorbancia que comúnmente es graficada como Absorbancia vs. Concentración.<sup>30</sup>

#### **3.3.1 Interferencias**

Las posibles interferencias que se pueden presentar en la espectrofotometría de absorción atómica se consideran clasificadas en tres tipos:

**3.3.1.1 Interferencias Químicas.** Resultan generalmente de la disociación incompleta de los compuestos de los elementos por determinar, en este caso los resultados analíticos pueden depender de otros elementos y radicales presentes en la solución, la mayoría de estas interferencias se remueven utilizando una llama de mayor temperatura.<sup>30</sup>

**3.3.1.2 Interferencias de Ionización.** Se producen cuando una gran parte de los átomos de la muestra se ionizan y absorben en una línea diferente de radiación que no pasa por el monocromador o que no es emitida por la lámpara.<sup>30</sup>

**3.3.1.3 Interferencias de matriz.** Son cambios en el resultado analítico producido por la naturaleza de la solución muestra, una concentración dada de un elemento en un solvente orgánico, podría absorber de dos a cuatro veces mas que en un solvente acuoso.

Otro efecto de matriz es el que presentan los sólidos disueltos en la solución. A medida que la solución se concentra, fluye más lentamente por el quemador y se disminuye la absorción.<sup>30</sup>

#### **3.4 VALIDACION INTERNA DE UN METODO ANALÍTICO**

La validación de métodos es una de las medidas reconocidas universalmente como parte necesaria de un sistema integral de garantía de la calidad en el ámbito de la química analítica<sup>1</sup>, validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos.<sup>2</sup> De hecho la definición que proporciona la norma ISO 17025 es semejante: *“La validación es la confirmación mediante un*

*examen y suministro de evidencias objetivas relacionadas con requisitos particulares que deben ser cumplidos”.*<sup>6</sup>

Según la norma ISO/IEC 17025, los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen en el laboratorio, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios, dicha validación debe realizarse teniendo en cuenta el intervalo de concentración y el tipo de matrices de las muestras de rutina, los criterios de calidad que al menos deben verificarse son la trazabilidad, la precisión y la incertidumbre de los resultados obtenidos con el método, ya que de esta forma, se obtienen resultados trazables y comparables.<sup>4</sup>

### **3.4.1 ALCANCE DE LOS ESTUDIOS DE VALIDACIÓN**

La medida en que un laboratorio debe emprender la validación de un método nuevo, modificado, poco conocido o conocido depende hasta cierto punto de la condición efectiva del método y de la capacidad del laboratorio. A continuación se dan especificaciones sobre el grado de las medidas de validación y verificación para diferentes circunstancias.<sup>1</sup>

**3.4.1.1 El laboratorio deberá utilizar un método validado “plenamente”.** El laboratorio debe comprobar que es capaz de lograr las características de funcionamiento del método publicadas. deberá realizar estudios de precisión, estudios de sesgo ( incluidos los de variación de matriz ) y posiblemente estudios de linealidad, los ensayos de robustez se pueden omitir.<sup>1</sup>

**3.4.1.2 El laboratorio deberá utilizar un método validado plenamente, pero deberá utilizarse una nueva matriz.** El laboratorio deberá comprobar que la nueva matriz no introduce nuevas fuentes de error en el sistema y deberán realizarse los mismos estudios de validación que en el caso anterior.

**3.4.1.3 El laboratorio deberá utilizar un método bien establecido, pero que no se ha estudiado en colaboración.** Deberán realizarse los mismos estudios de validación que en el caso anterior.

**3.4.1.4 El método se ha publicado en publicaciones científicas junto con algunas características analíticas.** El laboratorio deberá realizar estudios de precisión, de sesgo (incluidos estudios de variación de la matriz), de robustez y de linealidad.

### **3.4.2 REQUISITOS PARA EL ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS**

Los requisitos generales de cada una de las características de funcionamiento de un método son las siguientes<sup>1,21</sup>.

**3.4.2.1 Aplicabilidad.** La documentación que se elabora tras la validación deberá proporcionar, además de las especificaciones de funcionamiento, la siguiente información:

- identidad del analito, incluida la especificación cuando sea necesario
- intervalo de concentración que abarca la validación
- especificación de la gama de matrices del material de ensayo que cubre la validación
- un protocolo con la descripción de los equipos, reactivos, procedimiento, procedimientos de calibración y de control de la calidad y las medidas especiales de seguridad que fueran necesarias
- la aplicación a que se destina y sus requisitos de incertidumbre críticas

**3.4.2.2 Selectividad.** La selectividad es el grado de exactitud que puede alcanzar un método en la cuantificación del analito en presencia de interferentes.

**3.4.2.3 Calibración y linealidad.** Es útil conocer algunas de las características de la calibración al comienzo de la validación de un método porque afectan a la estrategia para el desarrollo óptimo del procedimiento; por ejemplo, si la función de calibración a) es lineal, b) pasa por el origen y c) no se ve afectada por la matriz del material de ensayo.

**3.4.2.4 Linealidad e intercepción.** A falta de directrices específicas, se deben aplicar las siguientes para la calibración lineal de una variable:

- se debe disponer de al menos seis patrones de calibración;
- los patrones de calibración se deben distribuir de forma regular en el intervalo de concentraciones de interés
- el intervalo debe abarcar del 0 al 150 % o del 50 al 150 % de la concentración probable, según cuál de los dos intervalos sea más adecuado y
- los patrones de calibración se deben analizar al menos por duplicado y preferentemente por triplicado o más veces, en un orden aleatorio.

**3.4.2.5 Intervalo.** El intervalo validado es el intervalo de concentración de analito en el cual el método se puede considerar validado. Es importante comprender que este intervalo no es necesariamente idéntico al intervalo útil de la calibración.

**3.4.2.6 Límite de detección.** En sentido general, el límite de detección es la menor cantidad o concentración de analito presente en la muestra de ensayo que se puede distinguir de cero de forma fiable.

**3.4.2.7 Límite de cuantificación.** Algunas veces esta precisión se define, de forma arbitraria, como el 10 % de la desviación típica relativa; otras veces el límite se considera, de forma igualmente arbitraria, como un múltiplo fijo (típicamente 2) del límite de detección.

**3.4.2.8 Sensibilidad.** La sensibilidad de un método es el gradiente de la función de calibración. Como es habitualmente arbitraria y depende de los ajustes instrumentales fijados, no es útil en la validación.

**3.4.2.9 Robustez.** La robustez de un método de análisis es la resistencia al cambio de los resultados obtenidos mediante un método de análisis cuando se realizan pequeñas modificaciones de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento.

**3.4.2.10 Aptitud para los fines.** La aptitud para los fines es el grado de correspondencia entre el funcionamiento de un método y los criterios, acordados entre el analista y el usuario final de los datos, que describen las necesidades del usuario final.

**3.4.2.11 Variación de la matriz.** Cuando se define el sistema de análisis que se pretende validar, especificando, entre otras cosas, la matriz del material de ensayo, puede existir un considerable margen de variación de la matriz dentro de la categoría especificada.<sup>1,21</sup>

**3.4.2.12 Veracidad**

**3.4.2.13 Precisión**

**3.4.2.14 Incertidumbre en la medición**

Se dedican otros apartados para una explicación mas detallada de los numerales l, m y n.

No necesariamente todos los parámetros de validación acabados de mencionar, se deben determinar en todos los casos, por tanto el protocolo a seguir depende de las necesidades particulares del laboratorio y de las condiciones de disponibilidad en que este se encuentre.<sup>1,7</sup>

### **3.5 PRECISION**

La precisión, según la norma ISO 3534, es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas.<sup>8</sup> Estas condiciones dependen de los factores que se varíen entre cada uno de los ensayos. Algunos de ellos son: el laboratorio, el analista, el equipo, el día en que se hace el ensayo, etc. Dependiendo de los factores que se varíen se pueden analizar tres tipos de precisión, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.<sup>4</sup>

La repetibilidad es la precisión más pequeña esperada, da una idea de la variabilidad que se espera cuando un método es aplicado por un solo analista en un equipo durante un periodo corto. En el otro extremo, la reproducibilidad, que representa la variabilidad que se obtiene cuando una muestra es analizada por varios laboratorios, tiene un valor más amplio. La precisión intermedia y más útil en casos específicos, se obtiene cuando se evalúan algunas condiciones en el análisis. Es importante que los valores de precisión sean representativos de las condiciones de ensayo probables.<sup>7</sup>

### **3.6 TRAZABILIDAD, EXACTITUD Y VERACIDAD**

El vocabulario internacional de metrología VIM, define la trazabilidad como la propiedad del resultado de una medida que le permite relacionarlo con referencias determinadas, generalmente nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones todas ellas con incertidumbres conocidas. Esta cadena de comparaciones nos permite tener confianza en los resultados obtenidos ya que, como los resultados son comparables a una referencia, podemos asegurar que los resultados son comparables a los obtenidos por otros laboratorios.

El concepto de trazabilidad es, pues, muy similar al concepto de exactitud, tradicionalmente, se había considerado como la ausencia de errores sistemáticos en el procedimiento. Según la norma ISO 3534, la exactitud se

define como el grado de concordancia entre los resultados de un ensayo y el valor de referencia aceptado<sup>8</sup>. Por tanto además de considerar los errores sistemáticos, el termino exactitud considera también los errores aleatorios ya que estos siempre están presentes en el resultado de una medida. Es decir exactitud es suma de dos conceptos veracidad y precisión.

La veracidad, también según la norma ISO 3534 , es el grado de concordancia entre el valor medio obtenido a partir de una serie de resultados de ensayo y un valor de referencia aceptado.<sup>8</sup> Por lo tanto un resultado es exacto si simultáneamente es veraz (libre de errores sistemáticos) y preciso (libre de errores aleatorios significativos)<sup>4</sup>.

### **3.7 INCERTIDUMBRE**

La guía ISO 3534-1, define incertidumbre como “una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero,”<sup>15,20</sup> su estimación por procedimientos adecuados toma en cuenta todos los efectos reconocidos que afectan el resultado, la precisión general, el sesgo, la incertidumbre del material de referencia, la incertidumbre de calibración, y cualquier otro efecto significativo, como pueden ser la temperatura o tiempo de análisis, sí aplican.<sup>7,15</sup>

El concepto de incertidumbre refleja, pues duda acerca de la exactitud del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de error y que se han aplicado las correcciones oportunas. Es decir, la incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado ya que indica cuanto puede alejarse un resultado del valor considerado verdadero. Por tanto los resultados siempre deben ir acompañados de su incertidumbre para que se puedan tomar decisiones basadas en dichos resultados.<sup>1,4,20</sup>

Una vez la trazabilidad del procedimiento analítico ha sido demostrada, la incertidumbre puede ser estimada para aquellos análisis, hechos a muestras de rutina, siempre y cuando, sean similares a las utilizadas en el aseguramiento de la trazabilidad.<sup>24</sup>

### **3.7.1 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE:**

#### **APROXIMACIONES EXISTENTES**

El cálculo de la incertidumbre no es sencillo debido al elevado número de fuentes de error presentes en un procedimiento analítico. Esto ha hecho que se hayan propuesto varias aproximaciones para su cálculo:

**3.7.1.1 Aproximación ISO.** Comúnmente, este método recibe el nombre de “*bottom-up*” debido a que divide el proceso de medida químico en sus partes fundamentales, cada una de las partes fundamentales se subdivide a la vez en contribuciones mas pequeñas, etc, posteriormente se calcula la incertidumbre de cada una de las partes y se combinan, para obtener la incertidumbre global del proceso de medida químico.<sup>4,28,24</sup>

**3.7.1.2 Lineamientos de la GUM.** Al igual que la aproximación ISO, la GUM cuantifica la incertidumbre mediante el cálculo de las contribuciones individuales y su posterior combinación ambas tanto la ISO como la GUM dividen el proceso en cuatro etapas<sup>15,20</sup>

- Especificación
- Identificación
- Cuantificación
- Combinación

**3.7.1.3 Aproximación propuesta por el Analytical Methods Committee.** Esta aproximación esta basada en calcular la incertidumbre utilizando la información generada en los ejercicios colaborativos. A esta aproximación también se le conoce como “top-down” debido a que cuantifica la incertidumbre desde un nivel superior. La aproximación top-down agrupa todas las posibles fuentes de

error en cuatro términos: El sesgo del método, el sesgo del laboratorio, el sesgo de la serie y el sesgo del error aleatorio<sup>28</sup>.

Las desventajas de la aproximación “ top-down” han hecho, que se propongan otras aproximación globales, basadas en utilizar la información de un laboratorio individual,<sup>4</sup>, por el contrario la mayoría de las aproximaciones globales que se proponen actualmente, se basan en utilizar la información obtenida en la validación del método,<sup>4,20,24,28</sup>, tal es el caso de la propuesta hecha por *Maroto y col*<sup>4,16</sup> en su tesis de doctorado, la cual estima la incertidumbre globalmente aprovechando la información generada durante la verificación de la trazabilidad y también la obtenida durante otras etapas de validación del método como los estudios de precisión, a continuación se profundiza sobre esta propuesta.

### **3.8 APROXIMACIÓN PROPUESTA PARA EL CÁLCULO GLOBAL DE LA INCERTIDUMBRE**

La concentración de las muestras de rutina *conc*, se obtiene mediante el uso de una curva de calibración. Esta concentración es calculada como :

$$conc = \frac{C_{en} - \delta_{cte}}{R} \quad (1)$$

Donde *C<sub>en</sub>* corresponde a la concentración encontrada con el procedimiento analítico, después de haber convertido la respuesta instrumental con la curva estándar, *R* es la recuperación del método y  $\delta_{cte}$  es el sesgo constante del método. La concentración de muestras futuras es obtenida mediante la corrección de los resultados por el sesgo constante y proporcional de acuerdo a la ecuación (1).

La incertidumbre estándar de la concentración *U* es obtenida por aplicación de la ley de propagación de los errores a la ecuación (1).

$$U = \frac{\sqrt{\left( (CON \cdot U(R))^2 + U(\delta_{CTE})^2 + U(CE)^2 \right)}{R} \quad (2)$$

Los dos primeros términos de esta ecuación considera la incertidumbre asociada con el aseguramiento de la veracidad:  $U(R)$  Es la incertidumbre de la recuperación del método, y  $U(\delta_{CTE})$  es la incertidumbre del sesgo constante. El tercer término  $U(CE)$ , es la incertidumbre de la concentración encontrada para la muestra de rutina con la curva estándar y considera la incertidumbre asociada con la precisión<sup>16</sup>.

### 3.9 ESTUDIOS DE PRECISION

Se propone un diseño anidado de tres factores, el cual permite obtener información acerca de la precisión intermedia y de la repetibilidad, además de evaluar la posible variación de la precisión del método con la concentración.<sup>16,22</sup>

Su diseño y el cálculo de las varianzas asociadas a cada factor se muestran claramente en el diseño metodológico.

### 3.10 ASEGURAMIENTO DE LA VERACIDAD

En el aseguramiento de la veracidad es necesario calcular dos tipos de sesgo, el proporcional (en términos de recuperación) y el constante, el cálculo de ambos sesgos se puede realizar mediante la utilización de muestras adicionales y dependerá de que dichas adiciones se hagan a blancos de muestras o bien a muestras que contienen el analito. Si las adiciones se hacen a blancos de muestras, se puede calcular tanto el sesgo proporcional como el sesgo constante a partir de la *recta de adiciones estándar*. Si las adiciones se hacen a muestras que contienen el analito, únicamente se puede calcular el sesgo

proporcional a partir de las muestras adicionadas.<sup>4,16,22</sup> El sesgo constante debe calcularse mediante el método de *Youden*.<sup>23</sup>

### 3.10.1 Método de las adiciones estándar. Sesgo proporcional.

Diferentes cantidades de analito son adicionados a un set de matrices las cuales son representativas de las muestras de rutina futuras. Las adiciones deben ser analizadas en condiciones intermedias y cada resultado es obtenido como la diferencia entre la respuesta instrumental antes y después de la adición. La recta de adiciones se obtiene graficando la concentración encontrada versus la concentración adicionada, la pendiente de esta recta es una estimación de la recuperación del método.<sup>16,22</sup>

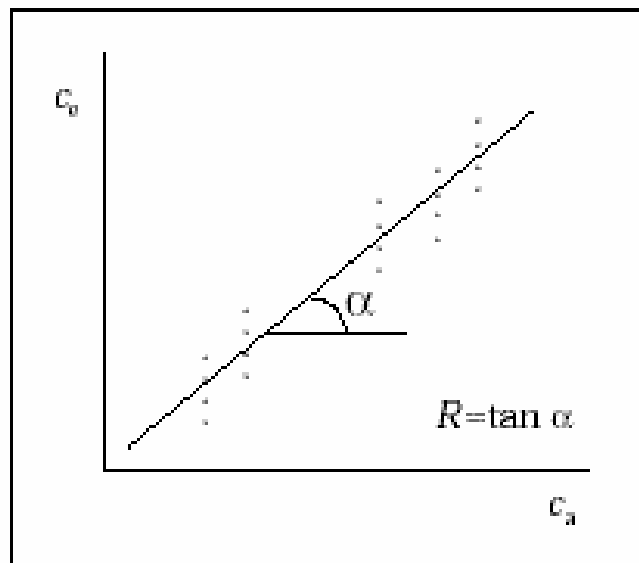


Figura 1. Curva de Adiciones estándar para estudio del sesgo proporcional<sup>4,16</sup>

### 3.10.2 Método de Youden. Sesgo constante.

El método de Youden (13) analiza varias cantidades  $W_i$  de una matriz bajo condiciones de repetibilidad o precisión intermedia, una curva de calibración es usada para convertir la respuesta instrumental en concentración.<sup>16</sup> el sesgo constante del método puede estimarse representando la recta de Youden como la concentración obtenida frente a la cantidad de muestra analizada. En este

caso la ordenada de la recta de Youden proporciona una estimación del sesgo constante.<sup>16,22,23</sup>

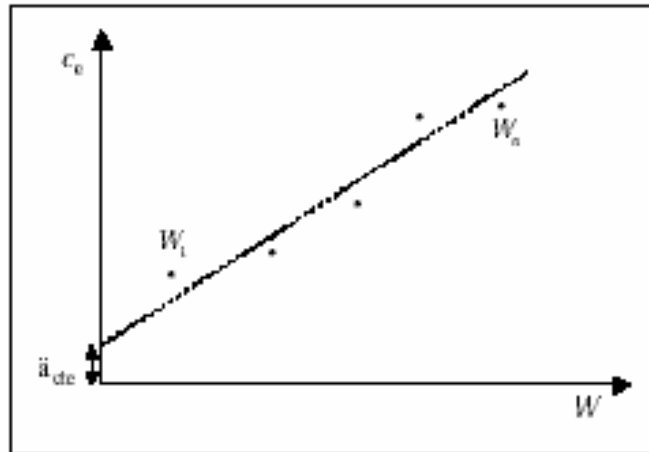


Figura 2. Curva de Youden para estudio del sesgo constante<sup>4,16</sup>

Una vez que se ha calculado el sesgo constante del método, debe realizarse un test t para evaluar si el método tiene un sesgo constante significativo, la incertidumbre y los grados de libertad dependen de cómo se haya obtenido la recta de Youden; los grados de libertad se obtienen como  $n-2$  (siendo  $n$  el número de cantidades de muestra,  $W$ , analizadas en la recta de Youden) y Si el sesgo constante es significativo, el método debe revisarse o bien deben corregirse los resultados por el sesgo constante.

### 3.11 ANÁLISIS DE LA VARIANZA

La estadística proporciona herramientas básicas para aplicar en Metrología y evaluar la calidad de los resultados obtenidos en laboratorios analíticos. Tanto en el ámbito de la Investigación y desarrollo, como en análisis de rutina, su contribución es decisiva. La validación de los métodos analíticos, la trazabilidad, la incertidumbre y el aseguramiento de la calidad de los resultados, aspectos

contemplados en la Norma ISO / IEC 17025:1999, requieren el uso de un número importante de técnicas estadísticas.<sup>29</sup>

El análisis de la varianza conocido como ANOVA, es una técnica estadística muy poderosa que se utiliza para separar y estimar las diferentes fuentes de la variación que influyen en el resultado, algunas causas de estas variaciones se deben principalmente al error aleatorio y al efecto controlado o efecto fijo, el cual como su nombre lo indica es controlado por el experimentador de acuerdo a su interés, Es así que su análisis se puede realizar variando uno o mas factores entendiéndose factor como cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento, en caso de variar dos factores se estaría hablando de un ANOVA de dos factores, sea cual fuere el caso esta herramienta estadística se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación provocada al cambiar el factor de control y de esta manera probar si una alteración del factor de control ocasiona diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.<sup>10,25</sup>

## **4. DISEÑO METODOLOGICO**

### *Hipótesis*

*El análisis de hierro en harina de trigo mediante absorción atómica, genera resultados con incertidumbres aceptadas para los fines del análisis.*

### **4.1 DETERMINACION DE HIERRO POR ABSORCION ATOMICA EN HARINA DE TRIGO FORTIFICADA**

Este método es aprobado por la AACC Y la AOAC para la determinación de hierro en varios productos incluidos cereales, productos a base de cereales, leche y sus derivados, entre otros.

#### **4.1.1 Principio del método**

Destrucción de la materia orgánica y extracción cuantitativa del contenido de hierro con ácido clorhídrico, posteriormente la muestra es atomizada en una llama aire-acetileno y la absorción es medida a 248 nm, para determinar la concentración del hierro.

#### **4.1.2 Equipos y material**

- Equipo de Absorción Atómica
- Balanza analítica
- Estufa de Calentamiento
- Mufla
- Cabina de Extracción
- Horno de secado
- Espátula
- Balones de 100, 250 mL y 1L
- Embudos de vidrio

- Varilla de agitación
- Crisoles de porcelana con tapa

#### **4.1.3 Reactivos**

- Sulfato ferroso y amonio hexahidratado  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  R. A
- $\text{H}_2\text{O}$  d.d. (destilada-desionizada.)
- HCl fumante R.A
- $\text{HNO}_3$  R.A

#### **4.1.4 Procedimiento**

##### **4.1.4.1 Preparación de la curva estándar.**

- Solución de 6 ppm de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : Disolver 3.512 g del reactivo en  $\text{H}_2\text{O}$  d.d, adicionar dos gotas de HCl fumante y diluir a 500 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  d.d, tomar 6 mL de esta solución y diluir a 1L con  $\text{H}_2\text{O}$  d.d.
- A partir de la solución de 6 ppm de Fe tomar alícuotas de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mL (0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6 y 4.2 ppm de Fe respectivamente), adicionar 2 mL de HCl fumante y aforar a 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  d.d.

Preparar el blanco de reactivos con  $\text{H}_2\text{O}$  d.d, adicionar 2 mL de HCl fumante y aforar a 100 ml

##### **4.1.4.2 Extracción**

- Pesar con exactitud entre 6 y 8 gramos de la harina, en un crisol de porcelana o preferiblemente de platino.
- Tapar los crisoles y Llevar  $550^\circ\text{C}$  por 6 horas hasta ceniza totalmente blanca, si la muestra aún tiene residuos carbonosos, enfriar y mojar las cenizas con 0.5 mL de  $\text{HNO}_3$ .

- Secar el residuo muy lentamente en la estufa y dentro de la cabina de extracción, posteriormente llevar a 550 °C por dos horas más.
- Permitir que los crisoles se enfríen y adicionar 10 mL de HCl concentrado, llevar muy lentamente a ebullición y cercano a la sequedad, luego disolver el residuo con 20 mL de HCl 2N, llevar a ebullición de forma lenta por 5 minutos.
- Filtrar en un balón de 250 mL, lavando cuidadosamente el crisol, adicionar H<sub>2</sub>O d.d. hasta aforar.
- Leer directamente en el equipo de absorción atómica, a 248 nm realizando un blanco de reactivos en cada lote de lecturas para permitir la corrección de señal.

#### 4.1.4.3 DETERMINACION

a) Introducir los siguientes parámetros en el equipo de absorción atómica

Parámetro	Especificación
Lámpara de Cátodo hueco	Fe
Flujo de Aire	10 L /min.
Flujo de Acetileno	2.5 L / min.
Longitud de onda	248.3 nm

b) Asegurarse de alinear el haz de luz proveniente de la lámpara, con la línea de salida del quemador, una vez alineado ajustar el corrector de fondo de deuterio.

d) Utilizar el blanco para purgar el equipo lo suficiente antes de leer la curva de calibración.

- e) Ajustar la línea base, pasando el blanco de calibración y hacer la lectura de los estándares de la curva.
- f) Hacer la lectura de las muestras y por cada grupo de 5, ajustar nuevamente la línea base, pasando el blanco de calibración.

#### Notas

- a) Tener cuidado de no contaminar las muestras con metales oxidados que puedan tener contacto con los crisoles o la muestra, tal como pinzas, hornos de secado, etc.
- b) Los protocolos de limpieza incluyen lavados con ácidos ( HCL y HNO<sub>3</sub>) y múltiples lavados con H<sub>2</sub>O d.d. por tanto todo el material se debe dejar en remojo (aprox. 3 horas) en HCl 0.5 N, posteriormente se debe purgar con HNO<sub>3</sub> 1% m/v, una vez hecho el enjuague con los ácidos, lavar completamente con agua destilada desionizada y secar en un horno.
- c) Si es necesario recalcar, preparar el blanco usando la misma cantidad de HCL-HNO<sub>3</sub> usada para las muestras.

#### **4.2 CALIBRACIÓN DE LA BALANZA ANALITICA**

Se utilizó el método de calibración por comparación directa con un patrón, aplicándolo al caso concreto de la calibración de una balanza. En donde se comparan los valores proporcionados por la balanza al medir uno o varios patrones (pesas)<sup>12</sup>. Dicha calibración fue contratada por el Laboratorio Departamental de Salud, con un laboratorio de metrología de la ciudad de Bogotá.

#### **4.3 PREVALIDACION**

Antes de iniciar el proceso de validación, se obtuvieron las características de funcionamiento del método, para lo cual se estableció por mediciones

programadas, el intervalo lineal, el límite de detección instrumental, el límite de detección del método, el límite de cuantificación y la sensibilidad.

#### 4.3.1 Intervalo Lineal

Para su determinación, inicialmente se hizo la lectura de 3 curvas de calibración con patrones de las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, y 15 ppm de hierro respectivamente, con las lecturas obtenidos se determinó el rango lineal utilizando la curva de Ringbom.

#### 4.3.2 Límite de detección

Para su determinación se corrieron en total 3 lotes, cada uno de ellos conformado por 5 soluciones del blanco, 5 del estándar de 0.05 ppm y 5 del estándar de 0.1 ppm de hierro; el orden de lectura fue el siguiente:

Blanco-Estándar 1 (0.05 ppm Fe) -Blanco –Estándar 2 (0.1 ppm Fe)

Para establecer el LDI y el LDM, se utilizó la ecuación (1) utilizando la señal del blanco y la del estándar de menor CV, respectivamente.

$$LD = \overline{SB} + 3C SB \quad (3)$$

Donde

$\overline{SB}$  = Corresponde a la señal media de los blancos o del patrón de concentración baja que se haya escogido.

$C SB$  = Es la desviación estándar para el blanco o estándar bajo.

#### 4.3.3 Limite de Cuantificación

Se utilizó la siguiente ecuación para su cálculo.

$$LC = \overline{SB} + 10 C SB \quad (4)$$

Donde:

$\overline{SB}$  = corresponde a la señal media del blanco o patrón bajo que se escogido.

$CSB$  = Es la desviación estándar para la señal del blanco o patrón bajo que se escogido.

## 4.4 VALIDACIÓN

### 4.4.1 Estudios de precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia entre días, para lo cual se utilizó un diseño anidado de tres factores: Concentración, Días y réplicas, la figura 3 ilustra el diseño anidado propuesto para la evaluación de la precisión:

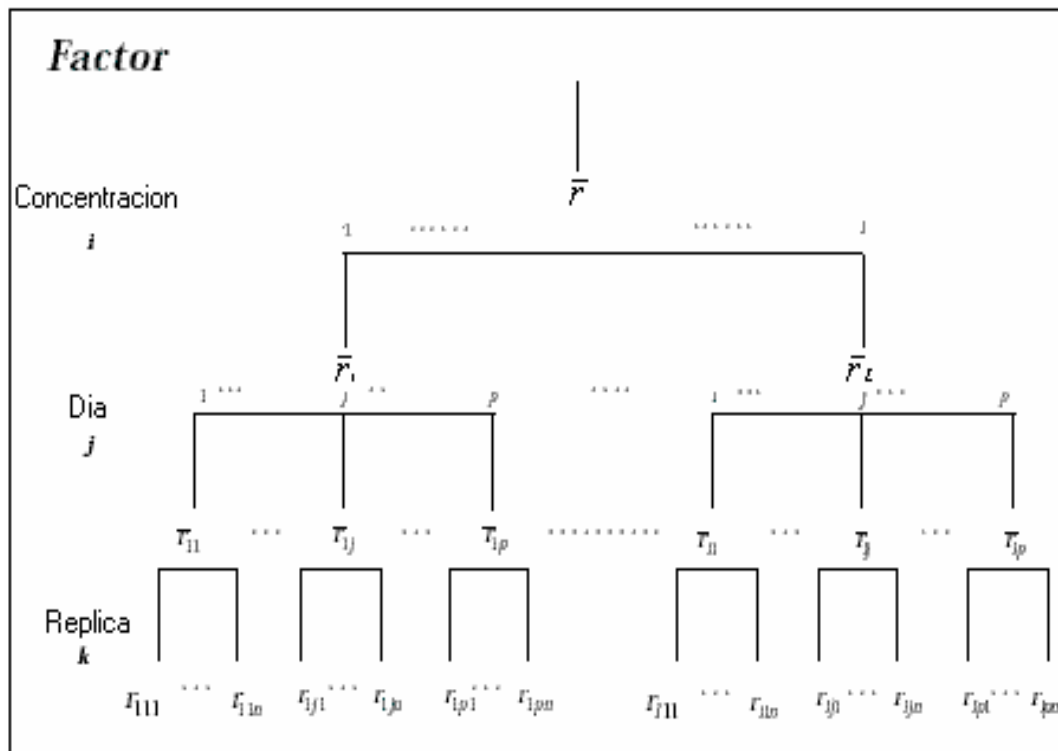


Figura 3. Diseño anidado-precisión.<sup>4</sup>

De acuerdo con el diseño, l corresponde a las concentraciones que se analizarán, p al número de días en que se analizara cada concentración, y n al número de réplicas hechas a diario, para cada concentración.  $r_{ijk}$  es el resultado  $k$ , del día  $j$ , para la muestra de concentración  $i$ .  $\bar{r}_{ij}$  es la media de todos los  $r_{ijk}$ ,  $\bar{r}_i$  corresponde al valor medio de todos los  $\bar{r}_{ij}$ .

El ANOVA típico y las expresiones utilizadas para calcular la varianza intermedia, entre concentraciones, días y repetibilidad se muestra en las tablas 1 y 2

Tabla 1. Análisis de varianza ANOVA, para el diseño anidado-precisión<sup>16</sup>

Fuente	Cuadrados Medios	G. L
Día	$CM_D = \frac{n \sum_i^l \sum_{j=1}^p (\bar{r}_{ij} - \bar{r}_i)^2}{l.(p-1)}$	$l.(p-1)$
Réplica	$CM_R = \frac{\sum_i^l \sum_j^p \sum_{k=1}^n (r_{ijk} - \bar{r}_{ij})^2}{l.p.(n-1)}$	$l.p.(n-1)$

Tabla 2 .Cálculo de las varianzas para el diseño anidado –Precisión.<sup>16</sup>

Varianza	Expresión	G. L
repetibilidad , $S_R^2$	$CM_R$	$p.(n - 1)$
entre días , $S_D^2$	$\frac{CM_D - CM_R}{n}$	
Intermedia , $S_I^2$	$S_R^2 + S_D^2$	

Para el estudio de la precisión se corrieron 7 lotes en 7 días diferentes, cada lote estuvo conformado de la siguiente manera: dos soluciones con la matriz de trabajo  $M_1$  y  $M_2$ , (Harina de trigo sin fortificar), cuatro réplicas de una adición baja a la matriz de trabajo , cuatro réplicas de una adición alta a la matriz de trabajo y una solución patrón de hierro, para chequear la respuesta del equipo.

#### 4.4.2 Verificación de la trazabilidad

**4.4.2.1 Veracidad.** En el aseguramiento de la veracidad, se evaluaron dos clases de sesgos el proporcional y el constante, mediante la técnica de las adiciones estándar<sup>16</sup> y el método de Youden<sup>16,23</sup>, respectivamente.

**a) Sesgo proporcional.** Para evaluar este tipo de sesgo, se hicieron adiciones de un estándar patrón de hierro, a dos matrices: harina de trigo fortificada para uso doméstico y para productos de panadería; Las adiciones se realizaron a 3 niveles de concentración distribuidos dentro del rango de validación, La figura 2 ilustra el diseño anidado utilizado.

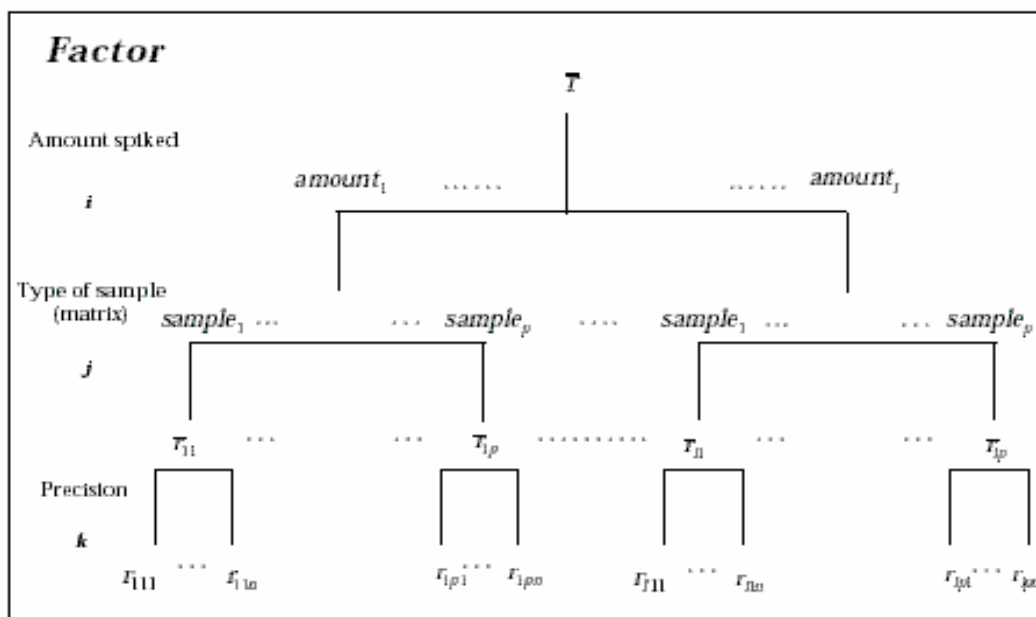


Figura 4. Diseño anidado para la estimación del sesgo proporcional.<sup>16</sup>

El diseño experimental provee información acerca de la variabilidad de la matriz y la precisión de los resultados obtenidos con muestras adicionadas,  $I$  son las cantidades de analito adicionado,  $p$  es el número diferente de muestras adicionadas y  $n$  es el número de análisis de cada muestra.  $r_{ijk}$  es el resultado del análisis  $k$  de la muestra  $j$  con la cantidad adicionada  $I$ , estos resultados son calculados como la diferencia entre la respuesta instrumental antes y después de cada adición.  $r_{ij}$  es la media de los resultados  $k$  obtenidos para la muestra  $j$  adicionada con la cantidad  $I$ .  $r_i$  es la media de todos los resultados obtenidos para una cantidad  $I$  de analito.

Para la ejecución del diseño anidado, se corrieron 10 lotes en 10 días distintos correspondientes al estudio del sesgo proporcional, cada uno de ellos estuvo compuesto de 10 soluciones identificadas de la siguiente manera:

- $B_0$  : blanco instrumental
- $A_b$  ,  $A_a$  : Soluciones de Estándar bajo y alto para chequear la respuesta del equipo.

- $M_1$  : Muestra natural : Harina de trigo fortificada para uso doméstico
- $M_2$ : Muestra natural : Harina de trigo para panificación y galletería
- $M_1A_b$  ,  $M_1A_m$  ,  $M_1A_a$ : Corresponden en su orden a las adiciones baja, media y alta para la muestra natural  $M_1$
- $M_2A_b$  ,  $M_2A_m$  ,  $M_2A_a$ : Corresponden en su orden a las adiciones baja, media y alta para la muestra natural  $M_2$

La pendiente de las adiciones estándar es una estimación de la recuperación  $R$  del método, la cual se utilizó para verificar que tan significativo es el sesgo proporcional.

El sesgo proporcional es no significativo si se cumple la siguiente inecuación:

$$|R - 1| \leq t_{\alpha} \cdot U_{(R)} \quad (5)$$

Donde  $t_{\alpha}$  corresponde al valor  $t$  tabulado para los grados de libertad asociados al diseño experimental utilizado, y  $U_{(R)}$  a la incertidumbre de la recuperación.

### **b) Sesgo Constante**

Se utilizó el método de Youden <sup>16,23</sup>, para la evaluación del sesgo constante, el diseño experimental utilizado se presenta en la figura 5 :

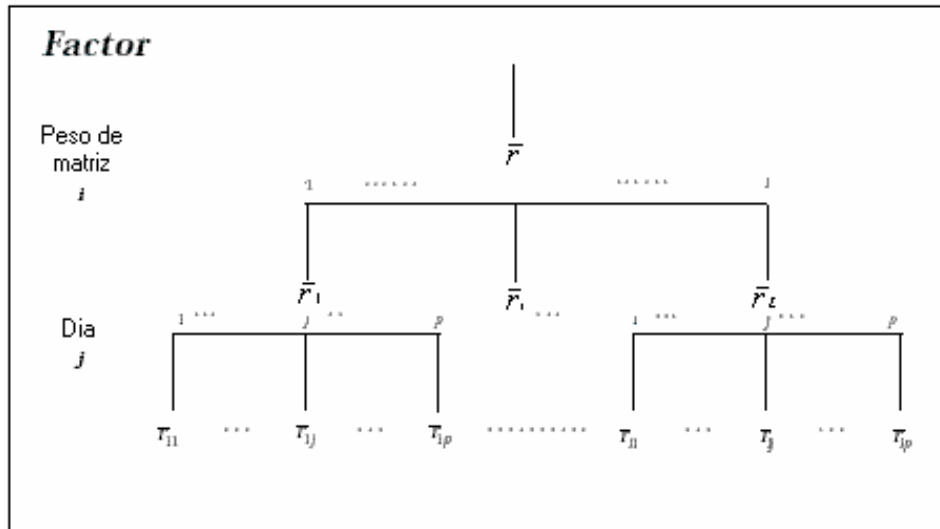


Figura 5. Diseño anidado para la estimación del sesgo constante.<sup>16</sup>

En total se corrieron 7 lotes conformados cada uno de ellos por 6 soluciones: dos estándar, bajo y alto para chequear la respuesta del equipo y 4 pesos diferentes de matriz de trabajo, los cuales se analizaron siguiendo el procedimiento analítico, la identificación de sus soluciones se hizo de la siguiente manera :

- $B_i$  = Blanco instrumental
- $E_b$  y  $E_a$  son respectivamente los estándar medio y alto para chequear la respuesta del equipo.
- $W_b$  = Peso bajo de la matriz de trabajo
- $W_{mb}$  = Peso medio-bajo de la matriz de trabajo
- $W_{ma}$  = Peso medio-alto de la matriz de trabajo
- $W_a$  = Peso alto de la matriz de trabajo.

Ninguno de los pesos analizados en este diseño, fue adicionado con concentración alguna de analito.

Con los datos obtenidos del diseño anidado, se construyó la grafica Concentración encontrada versus peso analizado y se utilizo el intercepto de la curva en el eje de las ordenas para estimar el sesgo constante  $\hat{\epsilon}_{CTE}$ .

$\hat{\epsilon}_{CTE}$  es no significativo si se cumple la siguiente inecuación<sup>16</sup>.

$$\left| \hat{\epsilon}_{CTE} \right| \leq t_{\alpha} \cdot U (\delta_{CTE}) \quad (6)$$

#### 4.4.2.2 ENSAYO INTERLABORATORIOS.

Finalizada la validación, el laboratorio participará en un programa interlaboratorios, dirigido por el INVIMA para el análisis de hierro en harina de trigo fortificada, la trazabilidad de cada uno de los laboratorios será evaluado a través de su coeficiente  $Z_i$  y calculado con la siguiente expresión.<sup>4,26</sup>

$$Z_i = \frac{X_i - X}{S} \quad (7)$$

$X$  = Valor de consenso aceptado para la referencia

$X_i$  = Valor promedio hallado en el laboratorio

$S$  = Desviación Estándar de los resultados

Si:

$Z_i < 2$  La competencia del laboratorio es satisfactoria

$2 < Z_i < 3$  La competencia del laboratorio es cuestionable

$3 < Z_i$  La competencia del laboratorio no es satisfactoria

#### 4.5 ESTIMACION DE LOS COMPONENTES DE LA INCERTIDUMBRE

Cada una de las incertidumbres se obtuvo a partir de la información generada durante la validación del método analítico, a continuación se muestran las ecuaciones principales, las demás expresiones se muestran en el anexo 1.

La ecuación general para el cálculo de la incertidumbre del método analítico es la siguiente:

$$U = \frac{\sqrt{\left( (CON \cdot U_{(R)})^2 + U_{(\delta_{CTE})}^2 + U_{(CE)}^2 \right)}{R} \quad (8)$$

Las ecuaciones para su cálculo se muestran a continuación:

##### 4.5.1 Incertidumbre de la concentración encontrada $U_{(CE)}$

$$U_{(CE)} = \sqrt{\left( \left( \frac{S_{MATRIZ}}{b_{CC}} \right)^2 + U_{(PRED)}^2 \right)} \quad (9)$$

Donde  $U_{(PRED)}$  corresponde a la incertidumbre asociada, al predecir una concentración con una curva de calibración:

$$U_{(PRED)} = \frac{1}{b_{CC}} \cdot \sqrt{\left( S_I^2 + S r_{CC}^2 + \left( \frac{1}{n_{CC}} + \frac{(C_{enc} - \bar{C})}{\sum (C_i - \bar{C})^2} \right) \right)} \quad (10)$$

Donde  $Sr_{CC}$  corresponde a la desviación estándar de la curva de calibración,  $C_i$  es la concentración del estándar  $i$ ,  $n_{cc}$  es el número de estándares de la curva de calibración,  $\bar{c}$  es la media de todos los estándares analizados y finalmente  $Sr^2$  es la varianza intermedia obtenida a partir de los estudios de precisión.<sup>16</sup>

**4.5.2 Incertidumbre de la recuperación del método  $U_{(R)}$ .** Se obtuvo como la suma de dos componentes:

$$U_{(R)} = \sqrt{\left( S(b_{AE})^2 + \left( \frac{R}{b_{CC}} \right)^2 \cdot S(b_{CC})^2 \right)} \quad (11)$$

El primer componente considera la incertidumbre de la pendiente de la curva de adiciones estándar, y es calculada mediante la desviación estándar de la pendiente de dicha curva, el segundo término considera la incertidumbre del error cometido, cuando la respuesta instrumental de las muestras adicionadas fueron convertidas a concentraciones mediante una curva de calibración.

$S(b_{CC})$  Corresponde a la desviación estándar de la pendiente de la curva de calibración.<sup>16</sup>

#### 4.5.3 Incertidumbre del sesgo constante

Esta incertidumbre se calculó como:

$$U_{(\delta_{CTE})} = \sqrt{\left( S(a_{you})^2 + U_{(CC)}^2 \right)} \quad (12)$$

Donde  $S(a_{you})$  es la desviación estándar del intercepto de la curva de Youden, obtenida cuando la concentración encontrada experimentalmente se graficó versus la cantidad de muestra (matriz) analizada, finalmente  $U_{(CC)}$ , corresponde a la incertidumbre asociada, al convertir la respuesta instrumental de la cantidad analizada a concentración, usando la curva de calibración. Este último término es calculado como:

$$U_{(CC)} = \sqrt{\left( \frac{S(a_{cc})^2}{b_{cc}^2} + \frac{S(b_{cc})^2 \cdot a_{you}^2}{b_{cc}^2} - 2 \frac{a_{you}}{b_{cc}^2} \cdot \text{COV}(a_{cc}, b_{cc}) \right)} \quad (13)$$

Donde  $S(a_{cc})$  es la desviación estándar del intercepto de la curva de calibración,  $S(b_{cc})$  corresponde a la desviación estándar de la pendiente para dicha curva,  $\text{COV}(a_{cc}, b_{cc})$  es la covarianza del intercepto y la pendiente de la curva de calibración y  $a_{you}$  es el intercepto de la curva de Youden.<sup>16</sup>

#### 4.6 RECOMENDACIONES

Finalizada la validación, y de acuerdo al análisis hecho a los resultados obtenidos, en cuanto a precisión, trazabilidad e incertidumbre de la técnica analítica, se hicieron las recomendaciones pertinentes.

### 5. RESULTADOS Y ANALISIS

#### 5.1 PREVALIDACION

**5.1.1 Intervalo lineal.** Inicialmente se hizo la lectura de 3 curvas de calibración, abarcando un rango entre 1 y 15 ppm de hierro, la tabla 3 muestra los datos de absorbancia, transmitancia, absortancia y logaritmo de la concentración, para

cada una de las concentraciones leídas y con los cuales se construyeron las graficas de la figuras 6 y 7, esta última a fin de determinar el rango lineal.

Tabla 3. Lecturas para las curvas de calibración iniciales.

[ ] ppm

Fe	Abs	Abs	Abs	Promedio	Transmitancia	Log [ ]	Absortancia
0	0.000	0.000	0.000	0,00	100		
1	0,088	0,084	0,089	0,087	81,8	0	18,2
3	0,238	0,234	0,241	0,237	57,8	0,477	42,2
4	0,297	0,295	0,294	0,295	50,6	0,602	49,4
5	0,359	0,352	0,365	0,359	43,8	0,699	56,2
6	0,426	0,436	0,435	0,432	63,7	0,778	36,3
9	0,554	0,582	0,591	0,580	26,5	0,954	73,5
12	0,668	0,679	0,681	0,681	21,1	1,08	78,9
15	0,750	0,750	0,749	0,750	17,8	1,175	82,2

Figura 6. Curva de calibración para determinar el intervalo lineal de hierro.

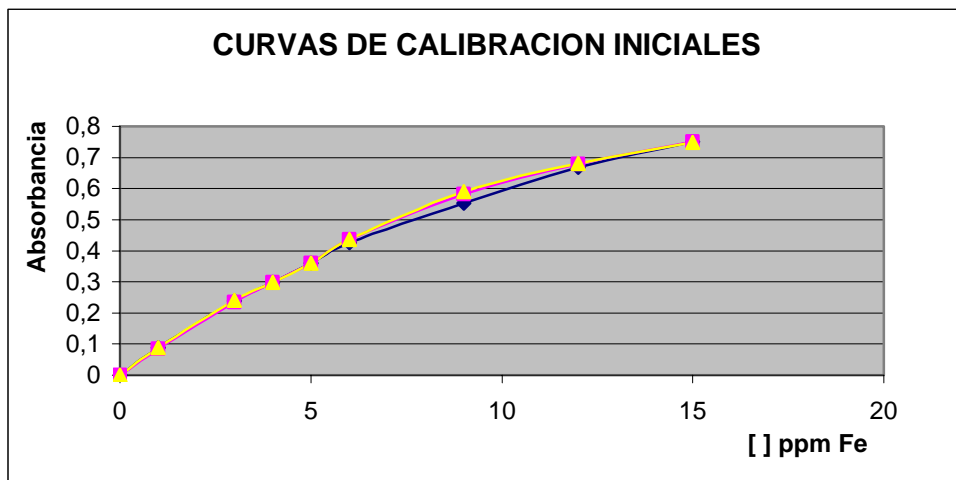
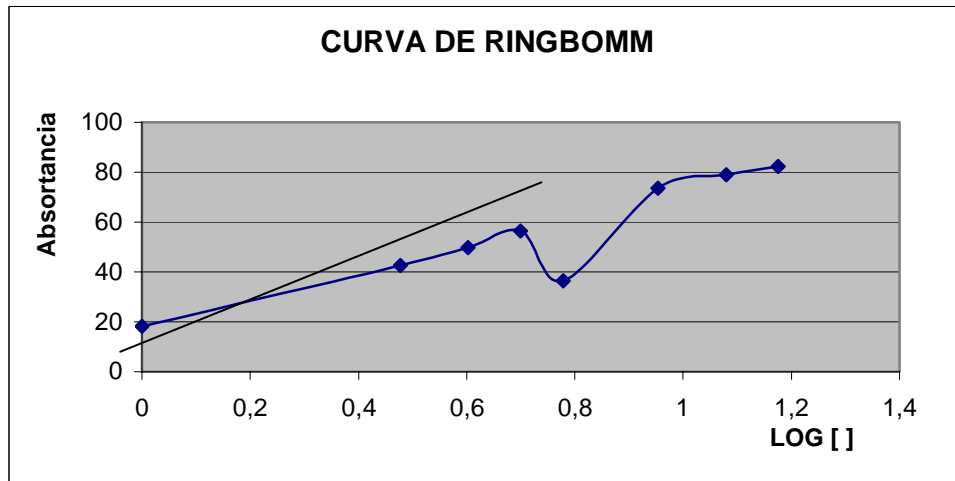


Figura 7. Curva de Ringbom para determinar el intervalo lineal.



De acuerdo a la curva de Ringbom, el intervalo lineal está comprendido entre 0 y 5.0 ppm, por lo cual se tomó el rango entre 0 y 4.2 ppm de hierro, como intervalo de trabajo, para construir las curvas de calibración.

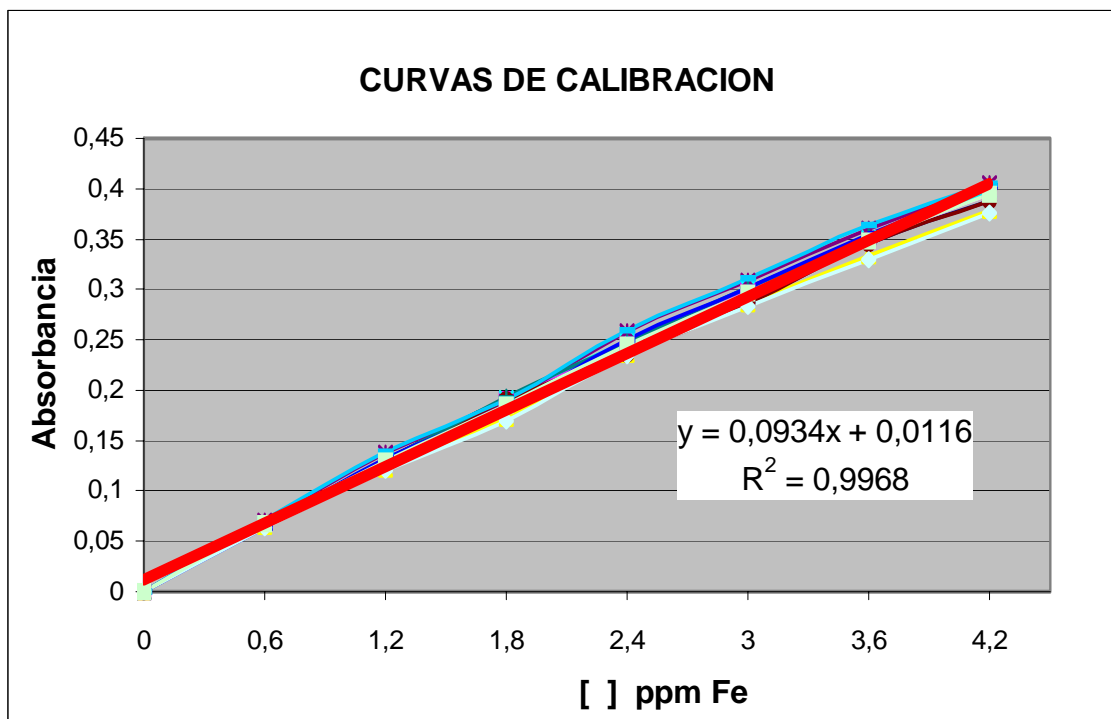
**5.1.2 Sensibilidad.** Los patrones de hierro utilizados para la curva de calibración abarcaron el rango comprendido entre 0 y 4.2 ppm de hierro, para los cuales se hizo la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica a una longitud de onda de 248 nm; en total se leyeron 10 curvas de calibración durante el proceso de validación. (Tabla 4)

Tabla 4. Lecturas de las curvas de calibración para el análisis de hierro.

[ ]											
ppm	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Prom
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,6	0,067	0,067	0,065	0,068	0,070	0,066	0,068	0,064	0,071	0,064	0,067
1,2	0,131	0,129	0,121	0,130	0,138	0,129	0,130	0,132	0,139	0,121	0,130
1,8	0,191	0,191	0,172	0,193	0,188	0,190	0,193	0,182	0,190	0,170	0,186
2,4	0,237	0,247	0,236	0,248	0,258	0,236	0,248	0,250	0,259	0,234	0,245
3,0	0,287	0,299	0,286	0,302	0,308	0,286	0,302	0,302	0,311	0,283	0,297
3,6	0,345	0,348	0,333	0,351	0,360	0,346	0,352	0,355	0,364	0,330	0,348
4,2	0,387	0,395	0,379	0,399	0,405	0,388	0,401	0,403	0,405	0,376	0,394
m	0,0916	0,0940	0,0902	0,0947	0,0966	0,0919	0,0952	0,0963	0,0969	0,0895	0,0934
r <sup>2</sup>	0,9958	0,9961	0,9973	0,9962	0,9955	0,9963	0,9967	0,9974	0,9949	0,9974	0,9964
a	0,0132	0,0122	0,0096	0,0124	0,0131	0,0121	0,0118	0,0088	0,0138	0,0092	0,0116

La figura 8 muestra las curvas de calibración obtenidas a lo largo del proceso de validación; en la tabla 4 se incluyen los valores de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación, el promedio y la desviación estándar para cada una de las curvas. La sensibilidad del método se obtuvo como el promedio para las diez curvas obtenidas durante el proceso de validación, el valor obtenido fue 0,0934 con un límite de confianza de  $\pm 0.0058$ .

Figura 8. Curvas de calibración para el análisis de hierro en harina de trigo



**5.1.3 Límite de Detección.**

La tabla 5 muestra las lecturas utilizadas para estimar el límite de detección y cuantificación, además de los valores rechazados, los cálculos de desviación estándar y el coeficiente de variación.

El LDI y el LDM, se calcularon con la ecuación (3) y las lecturas del blanco y el estándar de 0.05 ppm respectivamente; sus valores y los CV se muestran en la tabla 5. Para determinar el LDM se eligieron las lecturas del estándar de 0.05 ppm, ya que presentaron un CV mucho menor que el obtenido para las lecturas de los blancos.

Tabla 5. Lecturas para la determinación de LDI, LDM y LC.

Muestra	Blanco	0,05 ppm	0,1 ppm
1	0,0214	0,0493	0,1017
2	0,0107	0,0503	0,1006
3	0,0214		0,1017
4	0,0107	0,0490	0,1006
5	0,0214	0,0535	0,1017
1	0,0107	0,0525	0,0996
2	0,0214	0,0546	0,1028
3	0,0000	0,0557	0,0996
4	0,0107	0,0525	
5	0,0107	0,0482	0,0985
1	0,0107	0,0503	0,1049
2	0,0107	0,0491	0,0974
3	0,0210	0,0521	0,1060
4	0,0107	0,0535	0,1081
5	0,0210	0,0482	0,1039
Promedio	0,0142	0,0513	0,1019
S	0,0063	0,0024	0,0029
CV	44,4796	4,6291	2,8120
LDI	0,0332		
LDM		0,0585	
LC		0,0751	

#### 5.1.4 Limite de Cuantificación

Con la ecuación (4) y los valores obtenidos para el estándar de 0.05 ppm de Fe se obtuvo un LDM de 0.0751ppm.

## 5.2 VALIDACIÓN

### 5.2.1 Estudios de precisión

A continuación se muestran las lecturas obtenidas a partir del diseño experimental propuesto en la figura 3, para obtener información acerca de la repetibilidad y la precisión intermedia entre días del procedimiento analítico.

**5.2.1.1 Repetibilidad.** Las tablas 6 y 7 muestran los datos obtenidos durante los estudios de precisión para dos niveles de concentración, además de sus respectivos cálculos estadísticos.

En términos de repetibilidad, la precisión está dentro de los límites sugeridos,<sup>7,29</sup> por lo que los coeficientes de variación obtenidos 1.92 % y 0.93 % para las concentraciones 1.0 y 4.0 ppm respectivamente, no superan el 10 % aceptado; La prueba de la F para las varianzas obtenidas en cada una de las concentraciones, demuestra que la concentración (dentro del intervalo lineal) no afecta significativamente a la repetibilidad, ya que el valor de F Calculado no supera al tabulado (Tabla 8).

Tabla 6. Datos de repetibilidad para 1.0 ppm de hierro.

DATOS PRECISION 1,0 ppm Fe									
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Prom
N1		0,921			0,996	0,932	0,985	1,049	0,976
N2	1,017	0,942		0,910	0,985	0,942	0,974	1,017	0,969
N3	1,010	0,953	0,953	0,899	0,974	0,953	1,017	1,017	0,972
N4	1,081	0,910	0,974	0,910	0,963			1,038	0,979
Q Calculado	1,883		0,961	0,902		0,833	0,967		
Q Tabla	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	
Valores	0,653		0,760	0,728					

<b>Rechazados</b>			0,685			0,814	1,296		
<b>Promedio</b>	1,003	0,932	0,964	0,907	0,979	0,942	0,992	1,031	0,968
<b>S</b>	0,0393	0,0196	0,0151	0,0061	0,0138	0,0107	0,0223	0,0161	0,0178
<b>CV</b>	1,23	2,10	1,57	0,68	1,41	1,14	2,25	1,56	1,49

Tabla 7. Datos de repetibilidad para 4.0 ppm de hierro.

<b>DATOS PRECISION 4,0 ppm Fe</b>									
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Promedio
n1	3,972		3,951	4,004		3,908	4,047	3,951	3,972
n2	4,069	3,929	3,940	4,047	3,897	3,897	4,015	3,972	3,971
n3	3,940	3,961	3,929	3,994	3,865	3,876	4,004	3,951	3,940
n4		3,951		4,036	3,908	3,929	4,036	4,015	3,979
Q Cal	0,851	0,907	0,843		0,906				
Q Tabla	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	
Rechazos	3,223	3,330	3,544		3,223				
Rechazos									
Prom	3,994	3,947	3,940	4,020	3,890	3,903	4,026	3,972	3,961
S	0,0669	0,0164	0,0107	0,0255	0,0223	0,0223	0,0195	0,0303	0,0267
CV	1,67	0,41	0,27	0,63	0,57	0,57	0,49	0,76	0,67

Tabla 8. Prueba de la F ( $P= 0.005$  ,2 colas)

<b>VARIANZA</b>	
1,0 ppm	0,00032
4,0 ppm	0,00071
F Calculado	2,218
F Tabulado	4.995

**5.2.1.2 Reproducibilidad.** En la tabla 9 se muestran los valores correspondientes a los estudios de reproducibilidad o precisión intermedia entre días, cada uno de ellos se obtuvo como el promedio de las réplicas hechas cada día.

Tabla 9. Precisión Intermedia entre días

[ ]											
ppm	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Prom	S	CV
1,0000	1,003	0,932	0,964	0,907	0,979	0,942	0,992	1,031	0,968	0,035	3,58
4,0000	3,994	3,947	3,940	4,020	3,890	3,903	4,026	3,972	3,966	0,051	1,29

Los coeficientes de variación 3.58 y 1.29 obtenidos para los estándares 1.0 y 4.0 ppm de hierro respectivamente, no superan el 10 % aceptado<sup>7</sup>, indicando una reproducibilidad aceptable y una variación menos significativa a concentraciones cercanas al límite superior del intervalo lineal.

Tabla 10. Prueba de la F (**P** = 0.005; Dos colas) .

	VARIANZA
1,0 ppm	0,0012
4,0 ppm	0,0026
F Calculado	2,171
F Tabulado	4.995

La prueba de la F para las varianzas obtenidas en cada una de las concentraciones, demuestra que la concentración (para el intervalo lineal) no afecta significativamente a la reproducibilidad, ya que el valor de F calculado no supera al tabulado (Tabla 10).

Como se esperaba, La precisión en términos de reproducibilidad es mayor que la obtenida para la repetibilidad; sin embargo sus varianzas no son significativamente diferentes, a ninguno de los niveles de concentración evaluados, por lo que se asume que el factor día no afecta de forma significativa a la precisión y que el método es repetible y reproducible bajo las condiciones de análisis del laboratorio (tabla 11).

Tabla 11. Prueba de la F (**P** = 0.005; una cola) .

	1,0 ppm	4,0 ppm
Réplicas	0,00031	0,00071
Días	0,0012	0,0026
F Calculado	2,963	2,643
F Tabulado	3,787	3,787

Los datos rechazados durante los estudios de precisión se muestran en la tablas 6 y 7, sin embargo se omitieron algunos lotes donde se obtenían datos muy bajos y algunos con variaciones muy altas entre si, lo que indica que la precisión y en general las concentraciones de hierro encontradas, dependen en gran medida de la pericia y habilidad del analista, en el momento de hacer la extracción con HCl, que constituye la parte mas vulnerable al error en el procedimiento de análisis.

## 5.2.2 Veracidad

A continuación se muestran los valores determinados experimentalmente para el estudio del sesgo proporcional y constante, que abarcan lo correspondiente al estudio de la veracidad del método analítico.

**5.2.2.1 Sesgo Proporcional.** La tabla 12 muestra los valores de concentración en ppm de Fe, hallados para los 10 lotes correspondientes al estudio del sesgo

proporcional. Los coeficientes de variación obtenidos, indican una variación menos significativa conforme aumenta la concentración dentro del intervalo lineal, tanto para las adiciones como para los estándares.

Tabla 12. Datos en ppm Fe correspondientes al estudio del sesgo proporcional.

	Blanco	Eb	Ea	M1Ab	M1Am	M1Aa	M2Ab	M2Am	M2Aa
Lote 1	0,001	0,630	4,250		2,288	3,710	0,982	2,313	3,801
Lote 2	0,001	0,610	4,230	0,964	2,380		0,933		
Lote 3	0,000	0,610	4,220	0,923	2,306		0,951	2,377	3,901
Lote 4	0,002	0,630	4,180	1,006	2,498	3,690	0,985	2,366	3,812
Lote 5	0,001	0,620	4,230		2,441	3,833	0,942	2,355	3,633
Lote 6	0,002	0,601	4,220	0,953	2,301	3,854	0,931	2,291	3,779
Lote 7	0,001	0,640	4,180	0,931	2,484	3,758		2,313	3,900
Lote 8	0,001	0,610	4,190	0,103	2,373	3,801	0,996	2,334	3,812
Lote 9	0,002	0,590	4,220	0,964	2,250	3,912	0,914	2,409	3,865
Lote 10	0,001	0,620	4,240	0,974	2,510	3,779	0,995	2,345	3,592
Q Calculado				1,580		6,630	1,979	2,651	9,110
Q Tabla				0,464		0,464	0,464	0,464	0,464
Valores Rechazados				0,717		2,991	0,803	1,991	3,286
Promedio	0,0012	0,611	4,210	0,962	2,433	3,793	0,965	2,345	3,814
S	0,0006	0,0142	0,0226	0,0397	0,0732	0,118	0,0384	0,0721	0,126
CV	47,83	2,300	0,68	4,11	3,01	3,12	3,98	3,10	3,15
%E		1.833	0.24						
R				0,962	0,973	0,948	0,965	0,938	0,953

Durante el estudio del sesgo proporcional, la respuesta instrumental fue chequeada, con el fin de identificar, si el posible sesgo provenía de alguna falla instrumental o si por el contrario se debía al procedimiento de recuperación hecho a la matriz; la tabla 13 muestra la prueba de la t para el promedio de los

estándares y el valor aceptado como verdadero; el hecho de que el  $t$  calculado, no supere el  $t$  crítico, indica que aún no se prueba la existencia de un posible error sistemático.

Tabla 13. Prueba de la  $t$  para una media y un estándar conocido. ( $P = 0.05$ ).

	Eb	Ea
[ ] Encontrada	0,611	4,210
[ ] Verdadera	0,600	4,200
t Calculado	0,292	0,191
t Critico	2,23	2,23

En las figuras 9 y 10, se describe el comportamiento para las adiciones hechas a las dos matrices; Los pendientes obtenidas para harina domestica e industrial indican que la recuperación del método es aceptable, ya que su valor promedio 0.957 se encuentra en el intervalo  $0.95 < R < 1.05$ , sugerido para una buena recuperación <sup>7</sup>.

Figura 9. Curva de Adiciones estándar para harina tipo domestico.

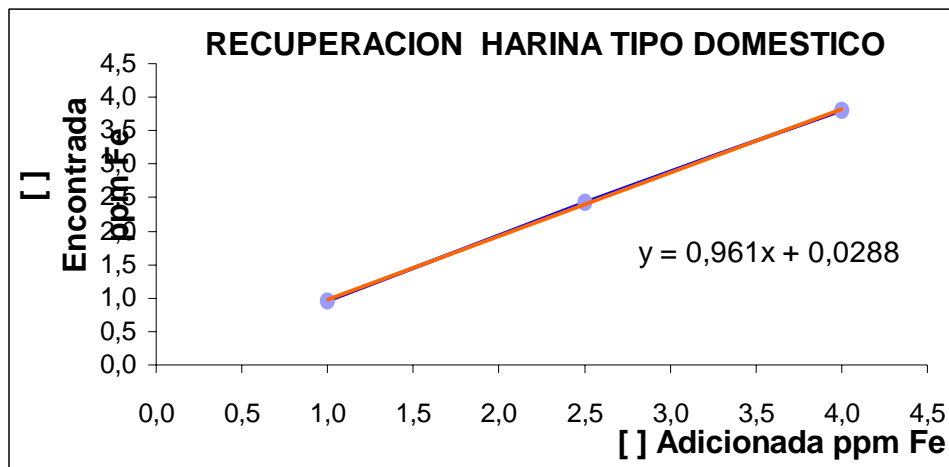
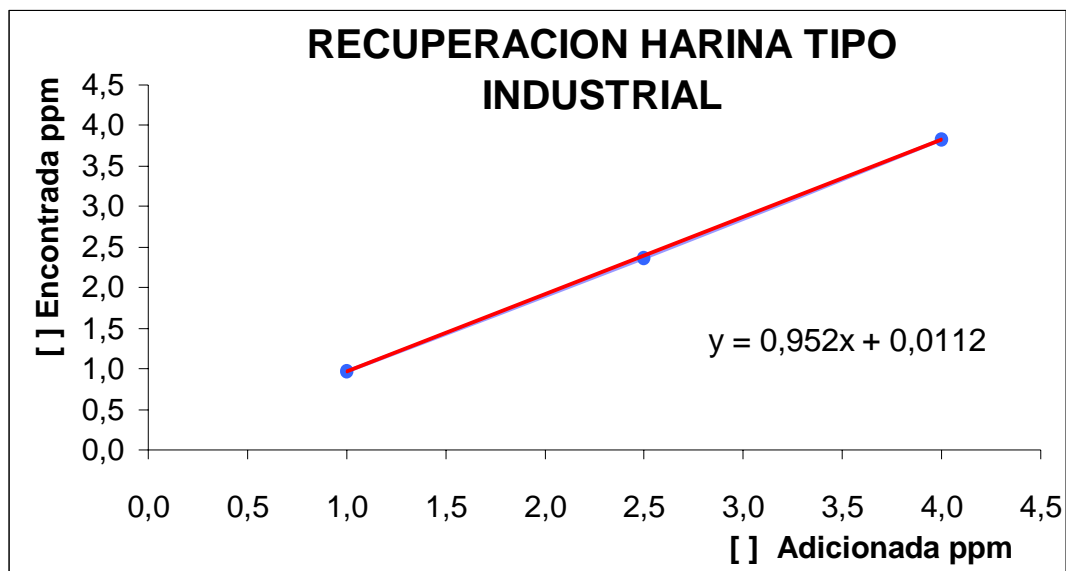


Figura 10. Curva de Adiciones estándar para harina tipo industrial.



La prueba de la t para las pendientes de las graficas 9 y 10, indica que no hay diferencia significativa entre las recuperaciones y por tanto no existe interferencia de la matriz, que afecte la recuperación las matrices evaluadas.

Tabla 14. Prueba de la t para comparar dos medias. (P = 0.05; Dos colas)

[ ] Adicionada ppm	Recuperación H. domestica	Recuperación H. industrial
1	0,961	0,965
2,5	0,973	0,938
4	0,948	0,953
R	0,961	0,952
t calculado	0.195	
t critico	2.1	

Para determinar si el sesgo proporcional es significativo, se sustituyó la recuperación del método 0.957, junto con la incertidumbre para la recuperación U(R) (Tabla 17), en la ecuación (5), la expresión que se obtuvo fue la siguiente:

$$0.049 < 2.26 \quad (9 \text{ Grados de libertad; } P = 0.05)$$

Debido a que se cumple la desigualdad planteada en la ecuación (3), se acepta la hipótesis nula, asumiendo que el sesgo proporcional no es significativo bajo las condiciones de análisis del laboratorio.

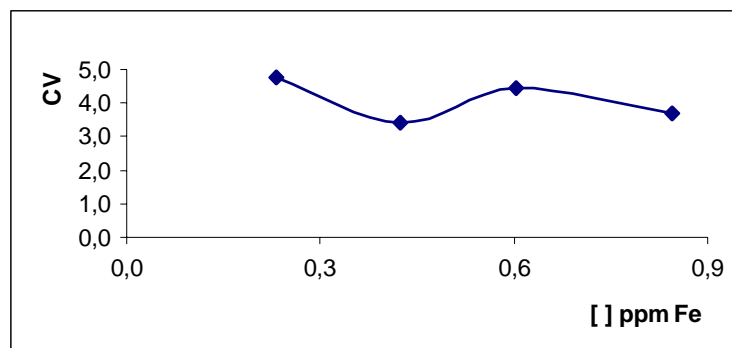
**5.2.2.2 Sesgo constante.** La tabla 15 muestra los valores obtenidos para cada uno de los 7 lotes correspondientes al estudio del sesgo constante.

Tabla 15. Lecturas correspondientes al estudio del sesgo constante.

Peso (g)	CONCENTRACIÓN EN ppm							Prom	S	CV
<b>2,0</b>	0,229	0,218	0,251	0,229	0,240	0,218	0,240	<b>0,232</b>	<b>0,0110</b>	<b>4,75</b>
<b>4,0</b>	0,454	0,411	0,422	0,411	0,422	0,411	0,433	<b>0,423</b>	<b>0,0145</b>	<b>3,43</b>
<b>6,0</b>	0,604	0,582	0,625	0,593	0,657	0,593	0,572	<b>0,604</b>	<b>0,0268</b>	<b>4,45</b>
<b>8,0</b>	0,872	0,829	0,807	0,797	0,872	0,882	0,850	<b>0,844</b>	<b>0,0313</b>	<b>3,71</b>

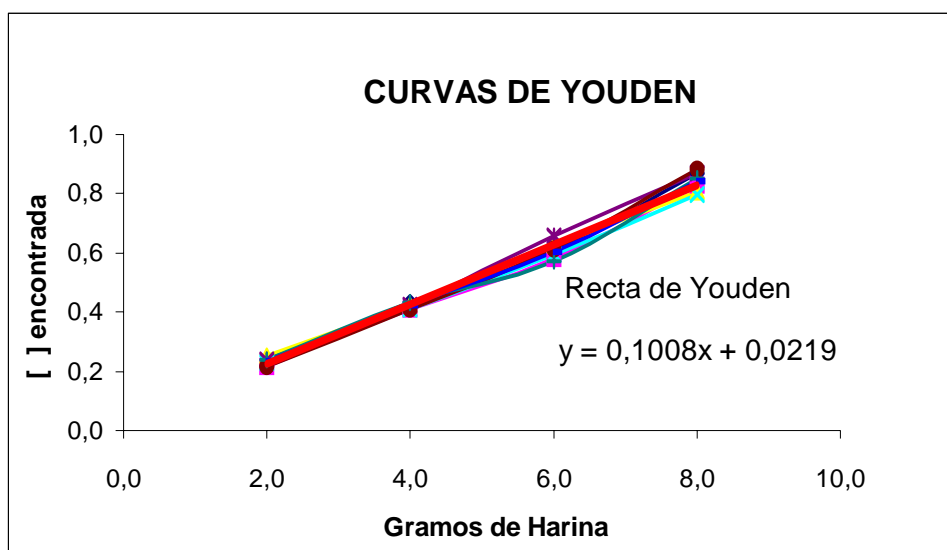
Aunque las concentraciones encontradas para los pesos de harina analizados, están cercanas al límite de cuantificación, los coeficientes de variación no superan el 5% indicando una variación no significativa aún a concentraciones bajas (figura 11).

Figura 11. CV para las concentraciones encontradas en el método de Youden.



La figura 12 describe de manera gráfica, las 7 curvas obtenidas durante los estudios del sesgo constante y cuyos datos se muestran en la tabla 11; La recta de Youden se obtuvo como el promedio de todas las curvas y su intercepto arrojó un valor de 0.0219, el cual corresponde al sesgo constante que presenta el método; Este valor, y el obtenido para U(CTE) (Tabla 18), se sustituyeron en la ecuación (6) para obtener así la expresión:  $0.0219 < 0.0907$  ( $P = 0.05$  ; 14 Grados de libertad), La cual indica que el sesgo constante, no es significativo a un nivel de confianza del 95 %.

Figura 12. Curvas de Youden para el estudio del sesgo constante.



Debido a que el sesgo proporcional y el sesgo constante, no son significativos se acepta la hipótesis de que la metodología analítica es trazable a un nivel de confianza del 95 %.

### 5.3 ESTIMACIÓN DE LOS COMPONENTES DE INCERTIDUMBRE

#### 5.3.1 Incertidumbre de la concentración encontrada

La tabla 16 muestra los valores para la incertidumbre de la concentración encontrada y sus principales componentes. El valor obtenido para U(CE) es

pequeño e indica que la incertidumbre proveniente de analizar una muestra de rutina no es significativa, debido a que el término S matriz es pequeño por lo que se obtuvo de evaluar matrices semejantes (harina de trigo para uso industrial y harina de trigo para uso doméstico)

Tabla 16. Componentes principales de U(CE)

	S matriz	b CC	U pred
	0,01395	0,0937	0,025467
U (CE)	±0,0228		

### 5.3.2 Incertidumbre de la recuperación del método U (R)

La incertidumbre de la recuperación del método U (R) se obtuvo al sustituir los valores de la tabla 17 en la ecuación (10)

Tabla 17. Principales componentes de U(R)

	S (b AE)	R	S (bcc)
	0,0023	0,956	0,0013
U ( R )	±0,0498		

### 5.3.3 Incertidumbre del sesgo constante

El cálculo de la incertidumbre U(CTE) se hizo, sustituyendo los valores de la tabla 18 en la ecuación (11), el valor obtenido fue ±0.4230

Tabla 18. Principales componentes de U (CTE)

S ( a you )	U ( CC )	U (CTE)
0,02517	0,034116	±0,0424

La varianza de los residuos de Youden (S(ryou), anexo 1), fue comparada con la varianza asociada a la precisión intermedia del método SI<sup>2</sup>, mediante una prueba de la F (P = 0.05); Debido a que la diferencia entre las varianzas no fue significativamente diferente, se asumió que *el efecto matriz* es el mismo para las cuatro pesos de harina analizados y que por tanto se estimó correctamente el sesgo constante.

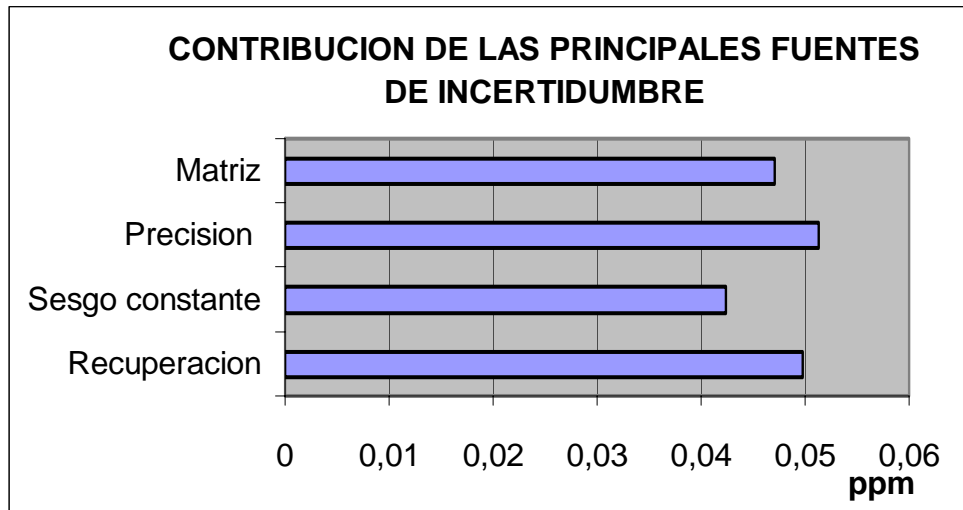
#### 5.3.4 Incertidumbre total

En la tabla 19 y la figura 13 se muestran el aporte a la incertidumbre global, por parte de las principales fuentes de variación evaluadas.

Tabla 19. Incertidumbre aportada por las principales fuentes evaluadas.

FUENTE	VALOR
Recuperación U(R)	0,0498
Sesgo Constante U (CTE)	0,0423
Precisión Intermedia SI	0,0513
Matriz S(Matriz)	0,0471

Figura 13. Diagrama de barras para las fuentes de incertidumbre evaluadas.

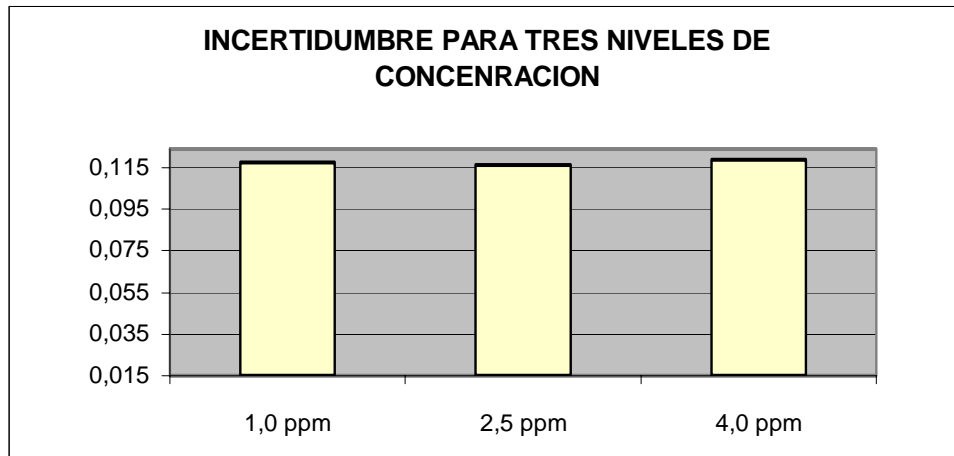


La tabla 20 muestra los valores de cada una de las fuentes de incertidumbre estimadas, además de la incertidumbre total para las tres concentraciones evaluadas durante la validación.

Tabla 20. Incertidumbre total para tres niveles de concentración.

[ ] ppm	U Total	CV
1,0	±0,1178	11.78 %
2,5	±0,1164	4.712%
4,0	±0,1188	2.970%

Figura 14. Incertidumbre total para 3 niveles de concentración.



Como lo muestra la figura 13, los valores de incertidumbre para los 3 niveles de concentración evaluados, no difieren significativamente por lo que puede asumirse, que se comporta de manera constante a lo largo del intervalo evaluado.

#### 5.4 ENSAYO INTERLABORATORIOS

El Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander, solicitó su participación en el programa interlaboratorios para el aseguramiento de la calidad para el monitoreo de hierro en harina de trigo fortificada organizado por el INVIMA, sin embargo y aunque el laboratorio ya está inscrito, no llegaron las muestras, lo cual imposibilitó la comprobación de la trazabilidad, y confiabilidad de los resultados mediante la comparación con otros laboratorios, quedando esta información pendiente para el reporte del trabajo final de grado, pero no así para información de uso interno del laboratorio.

## 6. CONCLUSIONES

- ✓ El método de lectura directa por espectrofotometría de absorción atómica a la llama en el espectrofotómetro Perkin Elmer 400 para el análisis de hierro en harina de trigo fortificada presenta los valores calibración y rendimiento que muestra la tabla 21.

Tabla 21. Intervalo de trabajo y calibración instrumental para análisis de hierro

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
Intervalo lineal	0,2 a 5,0 mg Fe/L
Correlación lineal	0,9963
LDI	0,0332 mg Fe / L
LDM	0,585 mg Fe / L
LC	0.0751 mg Fe / L
Sensibilidad	0,0934 ± 0,0058
Precisión Intermedia SI	0.0513 mg Fe / L
Recuperación R	0.957

- ✓ La repetibilidad y reproducibilidad no siguen tendencia alguna, al variar la concentración de las muestras de rutina.
- ✓ El método es repetible y reproducible para las muestras de rutina y las concentraciones comprendidas en el intervalo lineal hallado.
- ✓ La recuperación del método es aceptable para las matrices: Harina de trigo fortificada para uso domestico, y Harina de trigo fortificada para uso industrial.

- ✓ Se comprobó la veracidad y trazabilidad del método a nivel interno; quedando pendiente constatar dichos términos, mediante la participación en un ensayo interlaboratorios.
- ✓ La precisión y trazabilidad, dependen en gran medida, de la habilidad y experiencia del analista, durante el proceso de extracción del hierro con HCl.
- ✓ La incertidumbre global de los resultados se mantiene constante en el intervalo comprendido entre 0 y 4.0 ppm de hierro, y representa una variación superior al 11.8 % a concentraciones menores que 1 ppm de hierro e inferior a 4.12 % para concentraciones mayores a 2.5 ppm.
- ✓ Los niveles de rendimiento hallados en cuanto a precisión y trazabilidad, demuestran que el método de análisis de hierro es adecuado para su aplicación en el análisis de harina de trigo fortificada, bajo las condiciones particulares del laboratorio.
- ✓ La metodología propuesta por *Maroto y col*, para el cálculo de la incertidumbre utilizando la información generada durante la validación del método, no genera trabajo adicional y se desarrolla sin dificultad, de forma paralela al trabajo rutinario de un laboratorio.

## RECOMENDACIONES

- Se deben seguir los protocolos de limpieza con HCL y HNO<sub>3</sub>, para el material de vidrio a fin de obtener datos confiables, y eliminar así interferencias por adherencia del hierro.
- Se recomienda no calibrar el equipo con estándares almacenados de un día para otro, es necesario hacerlo con estándares frescos, ya que el hierro se adhiere como cloruro ferroso a las paredes del material de vidrio.
- Es necesario ajustar el blanco de absorbancia cada 5 muestras debido a que la señal tiende a aumentar, afectando las lecturas.
- Es necesario llevar a cenizas totalmente blancas, por lo que se recomienda a fin de disminuir el tiempo de análisis, calcinar la muestra por 5 horas inicialmente, enfriar, agregar 1 mL de HNO<sub>3</sub>, evaporar de forma muy lenta aprox. 60 ° C y calcinar nuevamente por dos horas A 550° C.
- Se recomienda analizar cantidades de harina comprendidas entre 6 y 8 gramos, con el fin de disminuir el CV de la incertidumbre total y obtener así datos con un mayor nivel de confianza.
- Realizar monitoreos periódicos a panaderías, y microempresas que utilizan de una u otra forma la harina de trigo como materia prima, a fin de asegurar los niveles adecuados de hierro, en dicho alimento.

- Se recomienda constatar la trazabilidad de los resultados generados en el laboratorio departamental de salud pública, mediante la participación periódica del mismo en los ensayos interlaboratorios.
  
- Ampliar el proceso de validación a las demás técnicas analíticas con que cuenta el Laboratorio Departamental de Salud Pública.

## REFERENCIAS

1. IUPAC. (2002) Validación por un solo laboratorio, examen de las directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis. Budapest -Hungría, Noviembre.
2. BOQUE, Ricard y Col. (2002) La validación de métodos analíticos. Universidad de Rovira. Tarragona España.
3. Estandarización de metodologías analíticas. Laboratorio de Salud Pública Bogotá junio del 2002.
4. MAROTO, Alicia. (2002) Cálculo de la incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tesis doctoral. Universidad de Rovira, Tarragona - España.
5. NIEVES, Luz. (2002) Validación y estandarización de técnicas para el análisis algunos parámetros fisicoquímicos del agua potable. Trabajo para optar al título de químico. Universidad Industrial de Santander.
6. NORMA ISO/IEC 17025. (1999) Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
7. SÁNCHEZ, Diana. (2002) Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría con EDTA. Universidad Distrital-Colombia.

8. RITU, Nalubola ; PENÉLOPE, Neslel. (2001) Analytical methods for monitoring wheat flour fortification with iron. October.
9. AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 15 edition, 1990
10. Miller J.C.; Miller J.N. (1993) Estadística para química Analítica. 2da Ed. Addison-Wesley Iberoamerican. S.A. Wilmington, Delaware.
11. BOQUE, Ricard. Exactitud y Trazabilidad. Universidad de Rovira, Tarragona España. 2002
12. BOQUE, Ricard; MAROTO, Alicia. (2002) Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: Calibración de una balanza analítica. Universidad de Rovira, Tarragona España.
13. RIUS, Xavier. (2002) Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: Calibración de material volumétrico. Universidad de Rovira, Tarragona España.
14. Sistema de garantía de calidad y de evaluación del proceso de fortificación de la harina de trigo. Programa de harina de trigo fortificada. Colombia 2002
15. WOLFGANG, A ; SCHMID, J. (2004) Guía para estimar la incertidumbre de la medición. Centro Nacional de Metrología. Revisión 1, CENAM, México.

16. MAROTO, Alicia ; BOQUE, Ricard and RIUS Xavier. (2001) Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples. *Anal. Chim. Acta*, 446 . P 133-145

17. Organismo boliviano de acreditación, OBA. Introducción al cálculo de la incertidumbre y comercio interno . Avda Camacho 1488 – Edificio anexo. La paz Bolivia. 2001

18. Organismo Boliviano de Acreditación OBA. Guía para los laboratorios que realizan validación de métodos de análisis químicos. OBA Versión 1.0. la paz Bolivia. 2001

19. BARWICK, V; ELLISON, S. (2000) Development and Harmonization of measurement uncertainty principles. “ protocol for Uncertainty evaluation from validation data”. VAM. January

20. EURACHEM.CITAC. (2000) Guide Quantifying Uncertainty in Analytical measurement . segunda edición.

21. CODEX ALIMENTARIUS-FAO. (2002) Validación por un solo laboratorio, examen de las directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis. Budapest , noviembre .

22. MAROTO, Alicia; BOQUE, Ricard and RIUS, Xavier. (2001) Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Anal. Chim. Acta*, 440: 171-184

23 YOU DEN, W. (1947) *Anal. Chem.* 19: 946-950

24. BOQUE, Ricard; RIUS, Xavier and MAROTO, Alicia. (1999) Evaluating Uncertainty in routine analysis. *Trends, Anal, Chem.* 18 : 577-584. Tarragona España.

25. TORRES, Lizzeth. (2003) Estandarización del método espectrofotométrico de la azometina-H para la determinación cuantitativa de boro total en tejido vegetal. Trabajo para optar al título de Químico. Universidad Industrial de Santander.

26 JAIMES, Silvana. (2001) Montaje y estandarización de algunas técnicas para el análisis de agua natural y potable. Trabajo para optar al título de Químico. Universidad Industrial de Santander.

27. MURCIA, Alix. (2003) Desarrollo y validación de un método para la determinación de pesticidas organofosforados en alimentos. Trabajo para optar al título de Químico. Universidad Industrial de Santander.

28. RIU, Jordi ; RIUS, Xavier. (2000) Critical discussion on the procedures to estimate uncertainties in chemical measurements. *Química Analítica.* 19: 85-94. Tarragona, España.

29. PRAND, Marcelo ; SCORPIAPINO, Claudia. ( 2000 ) Validación Interna del Método de Digestibilidad In Vitro de la Materia Orgánica (DIVMO) y Control Interno de la Calidad. facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos, Paraná.

## ANEXO 1. EXPRESIONES OMITIDAS EN EL CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

**Desviación estándar de los residuales de la curva de calibración. Ecuación (9).**

$$S_{rCC} = \sqrt{\frac{\sum_i (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2}}$$

Donde:

$Y_i$  , corresponde a la respuesta instrumental para la concentración  $i$ .

$\hat{Y}_i$  , corresponde al valor instrumental calculado para la concentración  $i$ .

**Desviación estándar para la pendiente de las adiciones estándar. Ecuación (10)**

$$S_{bAE} = \sqrt{\frac{S_{rAE}^2}{\sum_i (C_{adi} - \bar{C}_{ad})^2}}$$

$C_{adi}$  , Corresponde a la concentración adicionada  $i$ , a la matriz.

$\bar{C}_{ad}$  , Corresponde al promedio de las concentraciones adicionadas.

**Desviación estándar de los residuales para la curva de adiciones estándar.**

$$S_{rAE} = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \hat{Z}_i)^2}{n-2}}$$

$Z_i$  , corresponde a la concentración encontrada para la adición  $i$

$\hat{Z}_i$  , corresponde a la concentración calculada  $i$ , a partir de la recta de adiciones.

**Desviación estándar de la pendiente de la curva de calibración. Ecuación (10)**

$$S_{(bCC)} = \frac{SrCC}{\sum_i \sqrt{(C_i - \bar{C})^2}}$$

**Desviación estándar del intercepto de la curva de Youden. Ecuación (11)**

$$S_{(aYou)} = SrYou \sqrt{\frac{\sum_i W_i^2}{nYou \sum_i (W_i - \bar{W})^2}}$$

$W_i$  , Corresponde al peso en gramos de matriz analizada.

$\bar{W}$  , Corresponde al promedio de los pesos de matriz analizada.

**Desviación estándar residual para la curva de Youden.**

$$SrYou = \sqrt{\frac{\sum_i (H_i - \hat{H}_i)^2}{n-2}}$$

$H_i$  , Corresponde a la concentración encontrada para el peso  $i$  de matriz analizado.

$\hat{H}_i$  , Corresponde a la concentración calculada, para el peso  $i$  de matriz analizado.

**Coovarianza entre la pendiente y el intercepto de la curva de calibración.**

**Ecuación (12)**

$$COV(a_{CC}, b_{CC}) = \frac{\bar{c}(S_{rcc}^2)}{\sum_i \sqrt{(C_i - \bar{C})^2}}$$

**ANEXO 2 .TABLA PARA RECHAZO DE DATOS (Q DE DIXON) P = 0.05**

<b>TAMAÑO DE MUESTRA</b>	<b>VALOR CRÍTICO</b>
<i>4</i>	<i>0.831</i>
<i>5</i>	<i>0.717</i>
<i>6</i>	<i>0.621</i>
<i>7</i>	<i>0.570</i>
<i>8</i>	<i>0.524</i>
<i>9</i>	<i>0.492</i>
<i>10</i>	<i>0.464</i>

**ANEXO 3. TABLA DE LA DISTIRIBUCIÓN t ( Dos colas)**

<b>G.L</b>	<b>90%</b>	<b>95%</b>	<b>98%</b>	<b>99%</b>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58