

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento de Química

TRABAJO DE DIPLOMA

**Título: Diseño y verificación de una metodología
analítica para la determinación de hierro en
productos alimenticios fortificados**

Autor: Mayara Dominguez Castillo

Tutores:

MSc. Taimi Valdés Rojas.

MSc. Jorge de la Torre López

Santa Clara, noviembre 2022

Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Department of Chemistry

BACHELOR THESIS

Title: Design and verification of an analytical methodology for the determination of iron in fortified food products

Author: Mayara Dominguez Castillo.

Supervisors:

MSc.Taimi Valdés Rojas.

MSc. Jorge de la Torre López.

Santa Clara, november 2022
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubián” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

*La vida es una reacción química
que solo requiere de equilibrio.*

Anónimo

Dedicatoria

A mis padres por su ayuda incondicional

A mi hermana por ser mi modelo a seguir

A mi futura sobrina por ser mi inspiración

A mi esposo por darme su apoyo

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a mi familia: mi padre Manuel, mi hermana Yudis, mi esposo Alejandro, mis abuelos Manuel y Caridad, mi tía Lucía, mis primas Leynett y Lilli y a Abdel por la ayuda incondicional que me dieron en todo momento y en especial a mi madre Mercedes por las noches de desvelo que pasó a mi lado ayudándome y dándome la fuerza que necesitaba.

Agradezco a mis tutores Taimi y Jorge por la dedicación, sabiduría y paciencia que me proporcionaron.

A mis compañeros de aula y a mis amigos en especial a Lianet, Betsy, Grettel, Lisandra y Omar por los años de estudio, diversión, apoyo y amistad incondicional que me brindaron.

A todos los profesores que tuve durante mi carrera.

A la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas por darme la oportunidad de cumplir mis metas.

Y por último me agradezco a mí, por no darme por vencida a pesar de las dificultades que se me presentaron a lo largo de estos años.

A todos ellos mis más sinceros agradecimientos.

Resumen

El control de las producciones en la industria alimentaria es una necesidad y una obligación en la actualidad para garantizar la calidad y seguridad de los alimentos que se comercializan. La cuantificación del hierro en productos alimenticios fortificados forma parte de la estrategia del control de la calidad para este tipo de producciones. En la red de laboratorios de la Oficina Nacional de Inspección Estatal no existe un método de ensayo implementado para realizar este tipo de control. En el presente trabajo se diseñó un método de ensayo por espectroscopia UV-VIS usando la orto-fenantrolina para la determinación de hierro total en muestras de harina de trigo y leche entera en polvo fortificadas. Se llevó a cabo la verificación de dicho método teniendo en cuenta parámetros de linealidad, precisión y veracidad. Cada uno de los parámetros evaluados experimentalmente cumplieron con los criterios de aceptación definidos. Se estimó además el valor de la incertidumbre usando los datos de la validación intra-laboratorio.

Palabras Claves:

Alimentos fortificados, verificación, cuantificación de hierro, incertidumbre

Abstract

The control of production in the food industry is a necessity and an obligation today to guarantee the quality and safety of the food that is marketed. The quantification of iron in fortified food products is part of the quality control strategy for this type of production. In the network of laboratories of the National State Inspection Office there is no test method implemented to carry out this type of control. In the present work, a UV-VIS spectroscopy assay method was designed using ortho-phenanthroline for the determination of total iron in samples of wheat flour and fortified whole milk powder. The verification of said method was carried out taking into account parameters of linearity, precision and veracity. Each of the experimentally evaluated parameters met the defined acceptance criteria. The uncertainty value was also estimated using the intra-laboratory validation data.

Keywords:

Fortified foods, verification, iron quantification, uncertainty

Índice

Contenido

Introducción.....	1
Problema Científico:.....	2
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Fortificación de productos alimenticios	5
1.1.1 Definición e importancia.....	5
1.1.2 Proceso de fortificación de la harina de trigo y la leche en Cuba	7
1.2 Determinación de la concentración de hierro en productos alimenticios ...	9
1.2.1 Espectrometría de Plasma Acoplado Inductivamente.....	9
1.2.2 Espectroscopia de Absorción Atómica.....	9
1.2.3 Fundamentos de Espectroscopia UV-Vis	10
1.2.4 Método de 1,10-fenantrolina	11
1.3 Validación de métodos.....	13
1.3.1 Establecimiento del alcance de la validación	15
1.3.2 Descripción de un procedimiento de validación y verificación	17
1.3.3 Parámetros de desempeño del método	18
1.3.3.1 Linealidad:.....	18
1.3.3.2 Exactitud:	24
1.3.3.3 Veracidad:.....	24
1.3.3.4 Precisión:	25
1.3.3.4.1 Repetibilidad:	27

1.3.3.4.2 Reproducibilidad:	27
1.3.3.4.3 Reproducibilidad intermedia.....	27
1.3.3.5 Errores burdos	27
1.4.1 Definición e importancia.....	29
1.4.2 Métodos existentes	30
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 Diseño del procedimiento analítico de cuantificación de hierro en productos alimenticios fortificados usando espectroscopia UV-VIS	34
2.1.1 Fundamento y alcance del método	34
2.1.2 Equipos, materiales, reactivos y preparación de las disoluciones	34
2.1.3 Construcción de la curva de calibración	35
2.1.4 Procedimiento analítico.....	37
2.2 Plan de verificación.....	40
2.2.1 Linealidad	40
2.2.2 Precisión	41
2.2.2.1 Precisión por repetibilidad.....	41
2.2.2.2 Precisión por reproducibilidad intermedia	41
2.2.3 Veracidad.....	42
2.3 Estimación de la incertidumbre de la medición	42
CAPÍTULO III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	46
3.1 Informe de los resultados de la verificación	46
3.1.1 Linealidad	46
3.1.2 Precisión	48
3.1.2.1 Precisión por repetibilidad.....	48
3.1.2.2 Precisión por reproducibilidad intermedia	49

3.2 Estimación de la incertidumbre usando estudios de validación intra-laboratorio.....	51
Conclusiones.....	54
Recomendaciones	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
Anexos	58

Introducción

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más frecuente en el ámbito mundial, conlleva a múltiples enfermedades, alguna de ellas con peligro para la vida como la anemia ferripriva, esta situación puede ser remediada en parte con la fortificación de productos alimenticios, mejorando su calidad y por ende la nutrición de la población.

Las Naciones Unidas organizaron la Cumbre Mundial en Favor de la Infancia en 1990 y la Conferencia Internacional de Nutrición en 1992 y comprometieron a todos los países del mundo y a las organizaciones internacionales a desarrollar programas para disminuir la desnutrición, incluyendo las deficiencias de micronutrientes, especialmente del hierro [1].

La fortificación de alimentos de consumo masivo con micronutrientes se considera como el medio más adecuado para controlar esas deficiencias, por su efecto a corto plazo y bajo costo, factores que la hacen altamente sostenible.

En nuestro país, la deficiencia de hierro es muy frecuente, por lo que ha recibido especial atención en estos años. La fortificación de alimentos ha sido la principal estrategia para disminuir estas carencias nutricionales, fortificando así productos esenciales como la harina de trigo y la leche en polvo [1, 2].

Estos productos tienen gran impacto en la población cubana, la leche en polvo fortificada, por ejemplo, se produce en especial para niños entre cero y dos años de edad y para las mujeres gestantes y la harina de trigo tiene como destino la

canasta familiar normada, llegando a toda la población a través de la producción del pan [2].

Es de vital importancia como parte del control de la calidad de los productos fortificados determinar la cantidad de hierro presente en estos para conocer su dosificación, ya que siendo inferior no cumpliría la calidad requerida y sería un gasto económico sin razón, por otra parte, si se tratara de una sobredosis ocasionaría graves problemas de salud a la población.

Actualmente en Cuba, la red Nacional de laboratorios ONIE, encargados del control de la calidad de las producciones de alimentos en el Ministerio de la Industria Alimentaria no posee un método de ensayo implementado y validado para la determinación del hierro total en los productos alimenticios fortificados.

Problema Científico:

No existe un método de ensayo normalizado e implementado para la determinación de hierro total en productos alimenticios fortificados en la red de laboratorios de la Oficina Nacional de Inspección Estatal.

Objetivo General:

Implementar un método de ensayo para la determinación de hierro total en muestras de productos alimenticios fortificados en el laboratorio de la Dirección Territorial Villa Clara de la Oficina Nacional de Inspección Estatal.

Objetivos Específicos:

1. Diseñar un método de ensayo adecuado para la evaluación de la calidad de muestras de leche entera en polvo fortificada y harina de trigo fortificada en cuanto a la cuantificación del hierro total en la red de laboratorios de la Oficina Nacional de Inspección Estatal.
2. Verificar el método de ensayo diseñado para la cuantificación de hierro total en leche entera en polvo fortificada y harina de trigo fortificada.
3. Estimar la incertidumbre del resultado de la cuantificación de hierro total en muestras de leche entera en polvo fortificada y harina de trigo fortificada.

**CAPÍTULO I:
MARCO TEÓRICO**

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Fortificación de productos alimenticios

1.1.1 Definición e importancia

Según el Codex Alimentarius, la fortificación o enriquecimiento de alimentos es: “la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento con el propósito de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o en grupos específicos de población” [3]. Esta agregación no debe modificar o alterar de modo importante las características organolépticas (sabor, color, olor y textura).

El proceso que lleva la fortificación de los alimentos con diferentes vitaminas y minerales fue iniciado hace varios años, con el objetivo de prevenir deficiencias evidentes y clínicas de ellos mismos. La mayoría de la población sufre trastornos nutricionales relacionados con un escaso y bajo consumo de alimentos ricos en vitamina A y hierro lo que trae consigo anemia, enfermedades infecto-contagiosas, entre otros [4].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la deficiencia de hierro el primer desorden nutricional en el mundo [5]. Un 70 % del hierro del organismo esta como ion Fe^{2+} formando parte como elemento central de la hemoglobina en la sangre. Un 5 % se encuentra en la mioglobina y el resto formando parte de las enzimas citocromos (principales responsables del metabolismo de la mayoría de los fármacos antineoplásicos) y otras estructuras [5, 6].

En los seres humanos la absorción de la cantidad de hierro ingerida es limitada por el tipo de hierro que compone al alimento, donde podemos encontrar dos formas: hierro hemo y hierro no hemo.

El hierro hemo está presente en alimentos de origen animal formando parte de la hemoglobina y la mioglobina en su estado de oxidación Fe^{2+} , corresponde a un 5-10 % del hierro de la dieta y es más fácilmente asimilable, suele absorberse entre un 15-30 %. El hierro no hemo en forma inorgánica se encuentra en diferentes estados de oxidación Fe^{3+} , Fe^{2+} , FeO . Se encuentra generalmente en los vegetales, cereales, frutas y en el organismo humano en las ferroproteínas. Tiene tendencia a oxidarse de Fe^{2+} a Fe^{3+} dentro del organismo humano lo cual precipita y dificulta su absorción. Se suele absorber un 2-10 % del hierro no hemo ingerido. Este tipo de hierro se ubica en el trigo por consiguiente también está en la harina existiendo un mínimo aprovechamiento del elemento [7, 8].

Si bien es necesario el hierro para el buen funcionamiento de nuestro organismo, se puede producir también una sobredosis de este (toxicidad aguda). En el caso de los niños una ingesta accidental de suplementos de hierro puede ocasionar vómitos, diarreas, dolor abdominal, llegando a dificultades respiratorias, coma y muerte, también altas dosis de suplementos de hierro en adultos pueden traer complicaciones gastrointestinales como constipación, náusea, vómitos, diarreas, especialmente si son tomados con el estómago vacío.

Existe un alto potencial de tener toxicidad por hierro dado a que muy poca cantidad es excretada por el organismo y tiende a acumularse en los tejidos y

órganos cuando sus depósitos están saturados [4, 5, 9]. La dosis diaria recomendada de hierro para infantes y niños es de 0,27 a 15 mg al día y en adultos de 18 a 27 mg al día incluyendo embarazadas y la ingesta máxima tolerable para individuos sanos de 0 a 18 años es de 40 mg al día y para adultos incluyendo embarazadas es de 45 mg [9].

La importancia de la fortificación de alimentos se eleva cada vez más a nivel mundial, tratando de disminuir la mal nutrición de la población, es por eso que se hace necesario la cuantificación del hierro y micronutrientes en los mismos.

1.1.2 Proceso de fortificación de la harina de trigo y la leche en Cuba

Las harinas que provienen de los cereales y los productos lácteos en especial la leche son importantes vehículos para utilizarlos en la fortificación con hierro y diferentes micronutrientes, ya que estos son alimentos muy consumidos por la población en sus diferentes presentaciones, en el caso de la harina en el proceso de refinación se pierde un porcentaje de estos micronutrientes, por ende la fortificación permite la adición de cantidades de estos [8].

Desde el establecimiento del Programa Nacional de Acción para la Nutrición en Cuba el estado y el gobierno cubano consideraron una tarea de primer orden la lucha contra la deficiencia de micronutrientes, por lo que ha desarrollado programas integrales para combatirla [10].

De esta manera se han desarrollado proyectos de investigación-desarrollo y programas de intervención nutricional relacionados con las tres opciones básicas

para disminuir la deficiencia de micronutrientes: la suplementación, la fortificación de alimentos y la diversificación alimentaria.

En el caso de la fortificación de alimentos el país desarrolla acciones de base alimentaria mediante la fortificación con hierro de un alimento de amplio consumo para la población en general como la harina de trigo y la leche en polvo [2, 10].

La harina de trigo se utiliza fundamentalmente en la elaboración del pan. En Cuba el pan es un alimento altamente subsidiado que se distribuye diariamente a toda la población urbana o rural de todas las provincias del país, por lo que es un buen vehículo para desarrollar un programa de fortificación el cual se inició desde 1999. Actualmente todo el consumo de harina de trigo en la población cubana es de producción nacional. Más del 80 % se consume en forma de pan. Según la norma cubana: NC 877:2012: "Harina de Trigo. Especificaciones", la cantidad de hierro en el producto terminado expresado como sulfato ferroso anhidro debe estar entre 45-65 mg/kg del producto [10, 11].

Por otra parte, desde hace más de cinco décadas en Cuba todos los niños menores de siete años reciben diariamente el equivalente a un litro de leche lista para el consumo a precios altamente subsidiados. Debido a la elevada frecuencia de anemia observada en niños menores de un año, desde 2004 se consideró la necesidad de fortificar con hierro la leche que se distribuye de manera diferenciada a niños menores de un año. La leche entera en polvo destinada a este grupo de edad, se fortifica con compuestos de hierro a niveles de 10 mg por

1000 mL de leche en su forma lista para el consumo y su límite máximo es de 100 mg/kg de leche entera en polvo [2, 10, 11].

1.2 Determinación de la concentración de hierro en productos alimenticios

La bibliografía refiere varios métodos para la determinación de la concentración de hierro en productos alimenticios, los cuales se mencionan a continuación [12, 13]:

1. Espectrometría de Plasma Acoplado Inductivamente
2. Método espectrométrico de absorción atómica
3. Método colorimétrico (orto-fenantrolina)

1.2.1 Espectrometría de Plasma Acoplado Inductivamente

Es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de seis órdenes de magnitud ($\mu\text{g/L}$ – mg/L) además de poder llevar a cabo la determinación de los elementos en un análisis multielemental que provee la composición de la muestra analizada. Las partes principales del equipo son el Plasma Acoplado Inductivamente (ICP), dónde se generan los cationes a analizar y el Espectrómetro de Masas (MS) que actúa como filtro de masas [14].

1.2.2 Espectroscopia de Absorción Atómica

La espectroscopia de absorción atómica es un método para la detección de elementos metálicos, la materia compleja para su examinación tienen que

romperse mediante incineración en los átomos que la constituyen, para luego mediante el equipo se lea la absorbancia, la lámpara de cátodo hueco el cual incide un rayo luminoso de longitud de onda programada muy especializada dirigiéndose en un eje longitudinal precisa a las muestras, las cuales son aspiradas hacia el interior de una cámara de aire y acetileno como combustible para luego pasar a la llama, antes de ingresar la muestra se divide en micro gotas las cuales se evaporan para dar una sal seca que esta se disocia en parte en los átomos que se desean analizar, estos se vaporizan a 2000-6000 K y la concentración de átomos en fase vapor se determina midiendo la absorción o la emisión a longitudes de ondas características en la región UV-Vis del espectro electromagnético [13, 15].

1.2.3 Fundamentos de Espectroscopia UV-Vis

La espectrofotometría ultravioleta–visible es una técnica de absorción molecular y fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicaron al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras moleculares [12]. El color de una sustancia transmite luz en ciertos rangos de onda en la región visible del espectro, mientras que absorben luz de otros rangos de onda en dicha región. A la fracción de luz absorbida por una solución medida a un largo de onda dado se le conoce por absorbancia. La absorbancia está dada por la Ley de Bouguer-Lamber-Beer [16]:

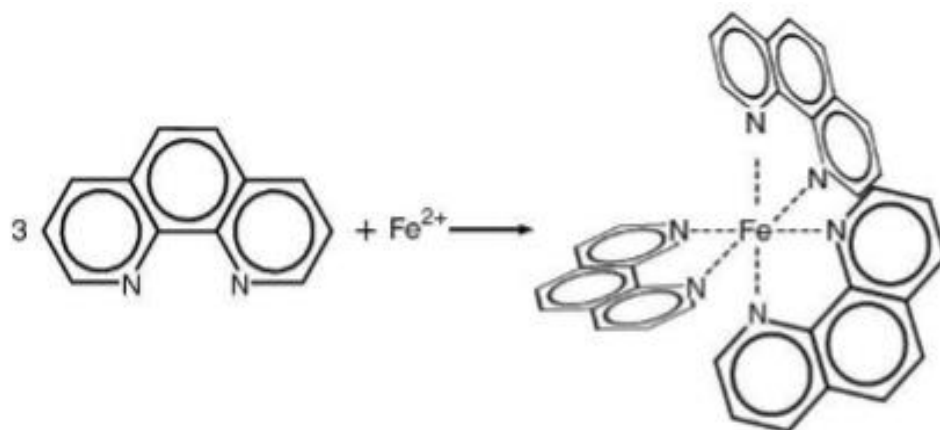
$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dónde: “A” es la absorbancia; “ ϵ ” es absortividad; “b” es la longitud del paso de luz (equivale al ancho de la cubeta) y “c” la concentración molar del analito.

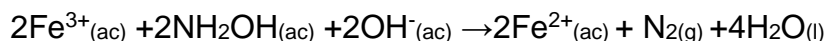
Para poder determinar la concentración de una especie mediante esta técnica, se necesita preparar una curva de calibración con soluciones cuyas concentraciones sean conocidas. La muestra conteniendo al analito debe producir una absorbancia entre el máximo y el mínimo de la curva de calibración. Las soluciones utilizadas para la curva de calibración en esta experiencia deberán caer en un rango de absorbancia entre 0,1 y 1,0 [17].

1.2.4 Método de 1,10-fenantrolina

El Método de 1,10-fenantrolina (orto-fenantrolina) se basa, en la reacción de ion Fe^{2+} con la orto-fenantrolina para formar una entidad de coordinación de color rojo-naranja, la cual presenta su absorbancia máxima de luz a una longitud de onda de 510 nm, siendo este compuesto de coordinación un quelato de tres moléculas de orto-fenantrolina con dos ligandos por cada átomo de Fe^{2+} [18]. La reacción de formación de las entidades de coordinación se describe según la ecuación:

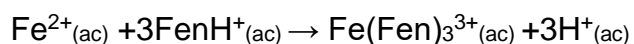


Para asegurarse de que todo el hierro presente en la muestra se encuentra en forma de Fe^{2+} se añade, antes de la formación del complejo, un agente reductor como es el clorhidrato de hidroxilamina, el cual reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} según la reacción:



Después de la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} , se da la formación de un complejo con la adición de orto-fenantrolina. En medio ácido la orto-fenantrolina que es una base débil, se encuentra en su forma protonada como ion 1,10-fenantrolinio (FenH^+) [18, 19].

La reacción puede ser descrita por la siguiente ecuación:



La formación cuantitativa de la entidad de coordinación se observa en el intervalo de pH entre 2 y 9. La solución coloreada permite determinar la concentración espectrofotométricamente por la ley de Bouguer-Lambert-Beer o por comparación visual. Se recomienda un pH próximo a 4 para evitar la precipitación de diversas sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Una vez formada, la entidad de coordinación es estable durante largos períodos de tiempo y se debe esperar diez minutos para que se desarrolle la máxima intensidad de color antes de realizar la medición de la absorbancia [20].

Como interferencias en este método se encuentran los oxidantes fuertes, cianuros, nitritos, y fosfatos (especialmente los polifosfatos), cromo, zinc en

concentración diez veces superior a la del hierro presente en la muestra, cobalto y cobre en concentración superior a 5 mg/L y níquel en concentración mayor a 2 mg/L. El bismuto, el cadmio, el mercurio, el anión molibdato y la plata precipitan con la orto-fenantrolina. La ebullición inicial en medio ácido convierte los polifosfatos en orto-fosfato y elimina cianuros y nitritos. La adición de orto-fenantrolina en exceso elimina los errores causados por concentraciones altas de especies químicas fuertemente oxidantes, y sustituye la que queda acomplejada por metales interferentes [19].

Si se tiene presente mucho color o materia orgánica, puede ser necesario evaporar la muestra, calcinar suavemente el residuo y redissolver en ácido. La calcinación debe llevarse a cabo en crisoles de sílice de porcelana que previamente han sido hervidos con ácido clorhídrico (HCl) 6 N. La presencia excesiva materia orgánica hace necesario la digestión antes de ser utilizado el procedimiento de extracción [20].

1.3 Validación de métodos

La validación es un proceso netamente experimental que se efectúa mediante estudios de laboratorio para evaluar o determinar la conveniencia o capacidad de un esquema analítico particular, cuyas características de diseño cumplen con los requerimientos metodológicos y de resultados para aplicación analítica propuesta. Es demostrar experimentalmente y en forma documentada que una metodología funciona para el fin propuesto [21].

Según la norma cubana NC 896: 2012: “Directrices sobre la terminología analítica” la validación es la verificación en la que los requisitos especificados son idóneos para un uso previsto [25].

La importancia de validar métodos analíticos se basa principalmente en los beneficios y ventajas que provee la validación de laboratorios de ensayo que son [22]:

- Obtener una acreditación por parte de un organismo acreditador.
- Aumento en la satisfacción de los clientes cuando solicitan un trabajo analítico. Brindar confianza en los resultados emitidos los cuales han demostrado ser adecuados para su propósito.
- Disminuir y controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato generado.
- Optimizar los procesos de medición al analizar lo mejor posible el mensurando, conllevando a una disminución en costos por repetición de pruebas y desperdicio de materiales y reactivos.

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Por ejemplo, en el laboratorio deben validarse [23]:

1. Métodos no normalizados
2. Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio
3. Método normalizado usado fuera de su campo de aplicación
4. Aplicaciones o modificaciones de métodos normalizados

El alcance de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar. También es necesaria la verificación cuando hay cambios importantes, como traslado de equipos, equipo nuevo pero similar, etc. [22, 23].

1.3.1 Establecimiento del alcance de la validación

Se diferencian tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero [24]:

1. Se trata de un método de ensayo normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en la norma.
2. Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado, por ejemplo, se hicieron modificaciones a los métodos descritos en la norma que pueden tener repercusión sobre la calidad de los resultados. Ejemplos: un método de extracción diferente, otra matriz, extensión del rango, etc.
3. Se trata de un método de ensayo interno, elaborado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos.

Existen diferentes categorías de métodos de ensayo según el grado de validación y el trabajo adicional recomendado, estas se muestran en la Tabla 1 [23].

Tabla 1: Categorías de métodos de ensayo según el grado de validación y el trabajo adicional recomendado.

Grado de validación externa	Validación interna recomendada
1. Método validado externamente mediante un ensayo colaborativo.	1. Verificación de veracidad y precisión.
2. Método validado externamente pero se utiliza para una nueva matriz o con nuevo instrumento.	2. Verificación de veracidad y precisión también es posible establecer el límite de detección.
3. Método bien establecido, pero no validado.	3. Verificación, es posible una validación más extensa.
4. Método publicado en la literatura científica y con las características de ejecución más importantes establecidas.	4. Verificación, es posible una validación más extensa.
5. Método publicado en la literatura científica sin presentación de las características de ejecución.	5. El método necesita una validación completa.
6. Método desarrollado internamente.	6. El método necesita una validación completa.

La clasificación “Método validado externamente mediante un ensayo colaborativo” indica métodos de ensayo que han sido comprobados mediante estudios colaborativos inter-laboratorios con resultado aceptable, e incluyendo información sobre las características de ejecución centrales, tales como rango de trabajo, veracidad, precisión y límite de cuantificación. El estudio debe haber sido

desarrollado, y sus resultados interpretados de acuerdo con protocolos aceptados internacionalmente, tales como la norma ISO (Organización Internacional de Normalización) 5725 o el protocolo armonizado ISO/IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) /AOAC (Association of Official Analytical Chemists) [23].

Por “Verificación” se entiende la acción que el laboratorio realiza previamente a la introducción de un método en la rutina de trabajo, para comprobar y documentar que es competente para utilizar el mismo. Esto significa que el laboratorio investiga y documenta que él, por ejemplo, en veracidad y precisión, obtiene resultados que se corresponden con las características de ejecución del método.

Por “Validación más extensa” se entiende la acción que el laboratorio realiza para examinar y documentar, total o parcialmente las características del método previamente a su introducción en la rutina de trabajo.

Por “Validación completa” se entiende un estudio que incluye todos los aspectos, importantes y posibles [23].

1.3.2 Descripción de un procedimiento de validación y verificación

Estas son recomendaciones sobre la conducción y secuencia de los pasos de un procedimiento de validación y verificación. Sin embargo, es conveniente siempre ajustar el trabajo a las posibilidades del laboratorio y a los requisitos del método en cuestión. No siempre es importante estudiar todos los pasos que aparecen en estas recomendaciones [24].

Procedimientos recomendados:

1. Diseño de un protocolo de validación o verificación
2. Determinación de la especificidad y la curva patrón
3. Determinación de la precisión, expresada como repetibilidad y reproducibilidad
4. Determinación de la veracidad
5. Determinación del rango de trabajo/rango de medición
6. Determinación del límite de detección
7. Determinación del límite de cuantificación/límite de determinación
8. Determinación de la robustez
9. Determinación de la sensibilidad
10. Evaluación de los resultados, desde el paso 2 al 8, contra el protocolo
11. Documentación del trabajo en un informe

1.33 Parámetros de desempeño del método

1.3.3.1 Linealidad:

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. Se considera como un criterio inicial de validación. La curva de calibración y el coeficiente de correlación es el que indica la linealidad principalmente [25].

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito, como sobre muestras problema que contengan concentraciones crecientes de analito, efectuándose posteriormente el tratamiento matemático de los resultados analíticos. Normalmente estos cálculos se efectúan con programas de computación. Las fases de este ensayo son las siguientes:

En primer lugar, conviene cerciorarse de que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar. Para ello puede efectuarse un tanteo previo con unos cuantos patrones que abarquen un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer, luego preparar una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes. El número de soluciones patrón puede estar comprendido entre 3 y 10 y el intervalo de concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra, efectuar el análisis siguiendo exactamente el procedimiento descrito y cada análisis se efectúa como mínimo por duplicado y por último determinar la curva de calibración que relaciona respuesta (áreas, alturas, absorbancias, etc.) con concentración o cantidad de analito [23].

La recta de calibración es del tipo: $y = bx + a$

Siendo “x” la concentración, “y” la respuesta, “b” el valor de la pendiente y “a” el término independiente o intercepto [23].

Fórmula para hallar b:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} = \frac{\sum_{xy} - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Fórmula para hallar a:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b\sum x}{n}$$

Representación gráfica de la recta de regresión

Si la recta no pasa por el origen de coordenadas el método a evaluar está afectado por un error sistemático (sesgo) por defecto o por exceso. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es muy buena o que el error experimental es importante y los límites de confianza serán amplios (hipérbolas anchas) [26].

Interpretación estadística de la regresión lineal

Un método común para estimar cuán bien los puntos experimentales se ajustan a una línea recta es calcular el coeficiente de correlación (r), este refleja el grado de relación o ligazón entre las variables “x” (concentración), “y” (respuesta). Su valor máximo es 1. Si “r” es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada [23].

Fórmulas para hallar r:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum_{xy} - \frac{\sum x - \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

En análisis químico se obtienen valores de “r” elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,990). Valores muy elevados de “r” no deben tomarse erróneamente como indicadores de linealidad; la linealidad se demuestra estadísticamente por otros procedimientos que se describen a continuación [26].

El coeficiente de determinación es el cuadrado del coeficiente de correlación e indica la proporción de la varianza total de “y” que es explicada por el modelo lineal de regresión. En las tablas de “r”, para n-2 grados de libertad el valor obtenido supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 % [23, 26].

Test de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad: como la significación estadística de la varianza de la pendiente “b” que, a mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito). La varianza de la pendiente (s_b^2) se utiliza como expresión matemática de la linealidad: a menor varianza mejor linealidad y se determina con una de las fórmulas siguientes [27]:

$$s_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Siendo $S_{y,x}^2$ la varianza del error experimental total, varianza residual o varianza de regresión de “y” sobre “x”.

El valor de $s_{y,x}^2$ se obtiene por diferentes fórmulas:

$$s_{y,x}^2 = \frac{\sum (y - \hat{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2}}{n - 2} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

Para expresar la linealidad también se utiliza la desviación típica o error típico de la pendiente S_b y la desviación típica relativa $S_{b \text{ rel.}}$ (%), cuyas fórmulas son [27]:

$$S_b = \sqrt{s_b^2} \quad S_{b(\text{rel.})}\% = \frac{S_b}{b} 100$$

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión:

$$b \pm t S_b$$

Siendo “t” el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida [23, 27].

Test de proporcionalidad

El valor de “a”, intercepción con el eje de ordenada en el origen, indica el error sistemático del método. En el caso ideal debe ser cero [26].

La varianza del término independiente se deduce de las fórmulas:

$$s_a^2 = s_b^2 \cdot \frac{\sum x^2}{n} = \frac{s_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{s_{y,x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} * \frac{\sum x^2}{n}$$

Siendo $s_{y,x}^2$ la varianza del error experimental total.

La desviación o error típico del término independiente es: S_a .

La desviación típica relativa del término independiente es igual a:

$$S_{a(rel.)}(\%) = \frac{S_a}{a} 100$$

Los límites de confianza del término independiente son los siguientes:

$$a \pm t S_a$$

Siendo “t” el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida. Si estos límites incluyen el cero, se cumple la condición de proporcionalidad [27].

Análisis de residuales

Se le llama residuos a las diferencias entre los valores observados y los pronosticados ($Y_1 - \hat{Y}_1$). Los residuos brindan información acerca de la exactitud de los pronósticos. Cuanto más pequeño es el error típico de los residuos, mejores son los pronósticos o sea mejor se ajusta la recta de regresión a la nube de puntos.

El análisis de residuales se puede llevar a cabo gráficamente o en forma analítica. Se representa en una gráfica bidimensional los residuos observados (eje y) para cada una de las variables “x” (eje x). Si existe una correlación lineal se observa

una nube de puntos en dirección horizontal y con anchura constante. En una falta de linealidad se observarían anchura de bandas no constantes [28].

1.3.3.2 Exactitud:

Es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia [25]. Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero, es una entidad con dos componentes (veracidad y precisión) pero considerada como una entidad global. Un estudio de exactitud involucra la determinación de la veracidad, la precisión y la robustez, así como la estimación de la incertidumbre de la medición y de los perfiles de exactitud [29].

1.3.3.3 Veracidad:

Se entiende por veracidad el grado de concordancia entre la expectativa relativa al resultado de un ensayo o de una medición y el valor verdadero [25]. En este contexto se entiende por resultado la media de determinaciones duplicadas o un resultado simple, dependiendo de lo que se considere normal para el método. Debe hacerse una distinción entre los diferentes métodos analíticos, sobre la base de si hay o no métodos de referencia disponibles y/o materiales de referencia certificados, así como esquemas de ensayos de aptitud. La medida de la veracidad se expresa habitualmente en términos de sesgo [22].

El sesgo es la diferencia entre el promedio calculado de los resultados de medición y un valor de referencia aceptado, es el error sistemático total, pudiendo existir uno o más componentes de error sistemático que contribuyen a este.

1.3.3.4 Precisión:

Es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea, es decir la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra.

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudio: repetibilidad, reproducibilidad y reproducibilidad intermedia en los que se determina la desviación típica “s” a partir de los resultados individuales obtenidos “xi”, según la fórmula [22]:

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

Donde: \bar{x} = media; $i = 1, 2, \dots, n$; n = número de determinaciones

La precisión puede expresarse directamente como desviación típica, como desviación típica relativa (RSD) o como el intervalo de confianza. La desviación típica relativa (coeficiente de variación) viene dada por [23]:

$$RSD(\%) = (s / \bar{x}) \cdot 100$$

El intervalo de confianza viene dado por: $x \pm \Delta$, donde $\Delta = 3 \cdot s$

El coeficiente 3 en la fórmula del intervalo de confianza es una buena aproximación para 10-15 mediciones y un intervalo de confianza de 99 %.

A partir de estos datos, se calculan las correspondientes desviaciones estándar relativas (RSD_r y RSD_R)

Para la reproducibilidad intermedia Horwitz diseñó una expresión:

$$\% PRSD_R = 2^{(1-0,5 \log c)}$$

Donde “c” es la concentración del analito en fracciones decimales. Sin embargo, un modelo más contemporáneo ha demostrado que la relación anterior se representa mejor si tres ecuaciones se usan para cubrir desde las altas a las bajas concentraciones.

Si $c < 1,2 \cdot 10^{-7}$ el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,22c$$

Si $1,210^{-7} \leq c \leq 0,138$ el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,02c^{0,8495}$$

Si $c > 0,1387$ el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,01c^{0,5}$$

Para la repetibilidad $\% RSD_r = 0,2$ a $0,3$ veces $\% RSD_R$ mientras que para la reproducibilidad intermedia $\% RSD_R = 0,2$ a 1 veces $\% RSD_R$ [23].

1.3.3.4.1 Repetibilidad:

Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, en un corto intervalo de tiempo [25].

1.3.3.4.2 Reproducibilidad: Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes(diferentes analistas, aparatos, días) [25].

1.3.3.4.3 Reproducibilidad intermedia: Es la concordancia de resultados cuando los análisis se llevan a cabo en el mismo laboratorio, utilizando el mismo método, pero ejecutados en diferentes momentos por diferentes analistas empleando, por ejemplo, diferentes lotes o reactivos [25].

1.3.3.5 Errores burdos

Un error burdo se puede definir como una observación en un conjunto de datos que parece ser inconsistente de ese conjunto de datos. Una de las estrategias para minimizar el efecto de los errores burdos es tratar de identificarlos y distinguirlos de cualquier variación casual, permitiendo al analista inspeccionar los datos sospechosos y si es necesario, corregir o remover los valores erróneos [23].

Existen varias pruebas para comprobar la presencia o no de errores burdos, siendo las más comúnmente empleadas, y además recomendadas por las

normas ISO y por la IUPAC, la prueba de Dixon, la de Grubbs y la de Cochran. Para mediciones replicadas las mejores pruebas reconocidas son la de Dixon y la de Grubbs [16].

Tres pruebas para detectar errores burdos en una distribución normal fueron desarrolladas y extendidas por F. E. Grubbs. Todos usan estadísticas basadas en las desviaciones estándar. La primera de estas es una prueba para un solo valor errático. La segunda prueba es para un par de valores erróneos a extremos opuestos del conjunto de datos y la tercera busca valores erráticos sobre el mismo extremo de conjunto de datos [16, 23].

En este trabajo se emplea la primera prueba de Grubbs. Para esta se calculan dos estadígrafos: G_{\min} y G_{\max}

$$G_{\min} = \frac{X_{\text{prom}} - X_1}{S}$$

$$G_{\max} = \frac{X_n - X_{\text{prom}}}{S}$$

Donde:

X_{prom} : es el valor promedio de los valores replicados

X_1 : es el valor mínimo de los valores replicados

X_n : es el valor máximo de los valores replicados

S : es la desviación estándar de los valores replicados

Si G_{\min} y/o G_{\max} exceden el valor crítico para un determinado nivel de confianza (usualmente 95 %) los valores probados se consideran errores burdos [23].

1.4 Incertidumbre de las mediciones químicas

1.4.1 Definición e importancia

La incertidumbre de la medición: es una forma de expresar el hecho de que, para un mensurando (magnitud específica de medir) y su resultado de medición dados, no hay un solo valor, sino un número infinito de valores dispersos alrededor del resultado, que son consistentes con todas las observaciones, datos y conocimientos que se tengan del mundo físico, y que con distintos grados de credibilidad pueden ser atribuidos al mensurando [30].

Según la norma cubana NC 896: 2012: "Directrices sobre la terminología analítica" la Incertidumbre de la medición es el parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores que se atribuyen a un mensurando sobre la base de la información utilizada [25].

En general, el uso de la palabra incertidumbre se relaciona con el concepto de duda. La palabra incertidumbre sin adjetivos se refiere a un parámetro asociado con la definición anterior o al conocimiento limitado acerca de un valor particular. La incertidumbre de la medición no implica duda acerca de la validez de un mensurando; por el contrario, el conocimiento de la incertidumbre implica el incremento de la confianza en la validez del resultado de una medición [31]

La incertidumbre puede ser expresada de varias formas como:

Incertidumbre típica de la medición (u): Incertidumbre de la medición expresada como una desviación típica.

Incertidumbre típica combinada (u_c): Incertidumbre típica del resultado de una medición cuando ese resultado se obtiene a partir de varios valores de incertidumbres de otras magnitudes.

Incertidumbre expandida (U , $U= k u_c$): Cantidad que define un intervalo del resultado de una medición que puede esperarse que incluya una proporción grande de la distribución de valores que podrán atribuirse razonablemente al mensurando.

(La incertidumbre expandida U se calcula sobre la base de la incertidumbre típica combinada u_c y un factor de cobertura k , según: $U= k u_c$) [32, 33].

La evaluación de la incertidumbre de la medición es un requisito obligatorio para los laboratorios acreditados o solicitantes de la acreditación. La estimación de este parámetro proporciona a los laboratorios una serie de ventajas debido a que añade valor y significado al resultado de la medición, supone una ayuda cuantitativa en la credibilidad de estos, constituye un punto de partida para la optimización de los procedimientos de ensayo gracias a un mayor conocimiento del proceso [34].

1.4.2 Métodos existentes para la estimación de la incertidumbre de la medición

La estimación de la incertidumbre no es sencilla debido al elevado número de fuentes de error presentes en un procedimiento analítico. Esto ha hecho que se hayan propuesto varios métodos para calcularla [35].

El método GUM (Guía para estimar la incertidumbre de Medida) se basa en la modelación matemática del proceso de medición, partiendo de la expresión que permite el cálculo del valor de la magnitud de interés, y la incorporación en la estimación de la incertidumbre de la medición de todas las incertidumbres relevantes originadas durante el proceso. Las incertidumbres relevantes se clasifican, se cuantifican, se combinan y finalmente se establece la incertidumbre combinada del resultado de la medición. Eventualmente la incertidumbre puede expresarse como incertidumbre expandida [32, 35].

El método propuesto por Eurachem (Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y temas relacionados) explica la posibilidad de calcular la incertidumbre agrupando factores, utilizando los diagramas causa–efecto para identificar de forma estructurada todas las fuentes de incertidumbre. Los diagramas causa y efecto se estructuran en factores principales o de primer orden y a su vez para cada factor principal se tienen en cuenta otros factores secundarios y así sucesivamente hasta considerar todos aquellos factores que puedan afectar la estimación de la magnitud media. Posteriormente en una etapa de reconciliación debe identificarse si algunas fuentes de incertidumbre que se han considerado más de una vez [35].

Otro método se basa en la posibilidad de estimar la incertidumbre de la medición a partir de los estimados de repetibilidad, reproducibilidad y veracidad del método utilizado, todos obtenidos mediante estudios colaborativos. Esta especificación

ha tenido gran aceptación internacional, siendo adoptada por Cuba como Norma Cubana no obligatoria [30].

Hay muchos procedimientos disponibles para calcular la incertidumbre en la medición de un resultado. Las directrices del Codex no recomiendan ningún planteamiento en particular, pero es importante que, independientemente del planteamiento que se utilice, el procedimiento sea fiable desde el punto de vista científico. Ningún planteamiento puede considerarse mejor que otro, siempre y cuando el procedimiento utilizado sea apropiado y fiable; esto significa que no haya ninguna “jerarquía” de los procedimientos [30, 32].

En general, los procedimientos se basan en un planteamiento de componente por componente “de abajo arriba” o en un enfoque “de arriba abajo”. El enfoque de abajo arriba se basa en la modelación matemática del proceso de medición y el enfoque de arriba abajo utiliza datos procedentes de ensayos en colaboración, estudios de aptitud, estudios de validación o muestras destinadas al control de calidad dentro del laboratorio, o bien en una combinación de dichos datos [32, 34].

**CAPÍTULO II:
MATERIALES Y MÉTODOS**

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe la etapa experimental de la investigación desarrollada, se especifican los reactivos, materiales, equipos y las condiciones a las cuales se efectúan los análisis.

2.1 Diseño del procedimiento analítico de cuantificación de hierro en productos alimenticios fortificados usando espectroscopia UV-VIS

2.1.1 Fundamento y alcance del método

El Método de orto-fenantrolina consiste en dar un tratamiento a la muestra el cual reduce al hierro a estado ferroso, por ebullición con ácido clorhídrico y clorhidrato de hidroxilamina. Se trata con 1,10-fenantrolina, hasta obtener un pH entre 3,2 a 3,3 dando la formación de un complejo rojo-naranja, siendo este un quelato de tres moléculas de fenantrolina por cada átomo de hierro ferroso. La solución coloreada obedece a la ley de Bouguer-Lamber-Beer.

2.1.2 Equipos, materiales, reactivos y preparación de las disoluciones

Para la determinación del hierro total se empleó un espectrofotómetro UV-Vis marca Hach, con celdas de 2,5 cm de camino óptico. Horno Mufla con regulador de temperatura marca Carbolite. Campana extractora de gases. Balanza Analítica marca Radwag. Mechero. Desecador de vidrio. Crisoles de porcelana. Pinzas de cápsula de porcelana. Matraces aforados de 50mL. Pipetas aforadas de 1, 2, 5 y 10 mL. Pipetas volumétricas de 5 mL. Todo el material volumétrico está certificado por la Oficina Territorial de Normalización.

Los reactivos empleados fueron alambre de hierro electrolítico 99% de pureza, ácido clorhídrico concentrado (37-38 %) de J.T. Baker, clorhidrato de hidroxilamina (99,5 %) de Merck, acetato de amonio (97 %) de AnalaR, o-fenantrolina (99,5 %) de Scharlau, ácido acético glacial (99,8 %) de J.T. Baker y ácido sulfúrico concentrado (95-98 %) de Sigma- Adrich.

Para preparar la disolución de clorhidrato de hidroxilamina al 10 % ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) se disolvió 10 g de clorhidrato de hidroxilamina en 100 mL de agua bidestilada. En el caso de la solución buffer de acetato de amonio se disolvió 62,5 g de acetato de amonio en 15 mL de agua bidestilada, se agregó 175 mL de ácido acético glacial y se diluyó en 250 mL de agua bidestilada. Para preparar la disolución o-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$) se disolvió 0,100 g de orto-fenantrolina en 100 mL de agua bidestilada, a la que se le añadió previamente 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Para la disolución de ácido sulfúrico 6 N se disolvió 90 mL de ácido sulfúrico en 500 mL de agua bidestilada.

Además, se utilizó una solución patrón de hierro 0,2 mg/mL en la que se disolvió 0,100 g de orto-fenantrolina en 100 mL de agua bidestilada, a la que se le añadió previamente 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y una solución de trabajo de hierro 0,005 mg/mL que se preparó a partir de la solución patrón tomando 12,5 mL de esta y diluyendo a 500 mL con agua bidestilada.

2.1.3 Construcción de la curva de calibración

Se construyó curva de calibración utilizando hierro patrón una vez comprobada su linealidad. Para ello se utilizaron ocho matraces aforados de 50 mL, se añadió

5 mL de agua bidestilada y se transfirieron las cantidades de solución de trabajo de hierro indicadas a continuación:

Tabla 2: Volúmenes de la solución de trabajo de hierro y concentraciones de hierro en la solución

Volumen de la solución de trabajo de hierro de 0,005 mg/mL	Concentración de hierro en la solución de comparación para fotometría
mL	µg/mL
0 (1)	0
1,0	0,1
2,0	0,2
3,0	0,3
4,0	0,4
5,0	0,5
8,0	0,8
10,0	1,0

(1) Solución de ensayo en blanco

A los patrones se les añadieron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y 1 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina. Para desarrollar el color se agregaron 10 mL de solución reguladora de acetato de amonio y 2 mL de solución reactivo de orto-fenantrolina, se llevó a aforo con agua bidestilada y se homogenizó agitando varias veces. Se esperaron 15 minutos para lograr un máximo desarrollo

del color y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm, ajustando el cero del instrumento con el blanco.

Cada punto de la curva se realizó por duplicado.

2.1.4 Procedimiento analítico

Para la determinación del hierro total en muestras de harina de trigo y leche entera en polvo fortificadas se incineraron las muestras siguiendo el método de cenizas totales. Primero se limpiaron bien los crisoles con agua bidestilada, inmediatamente antes de usarlos, se calentaron en el horno hasta que tuvieron un peso constante, esta acción tardó 15 minutos, luego se refrescaron hasta la temperatura ambiente en la desecadora por lo menos 1 hora y se pesaron con una precisión de 0,1 mg.

Porción de ensayo

La porción de la muestra sometida a ensayo primeramente se sometió a un proceso de incineración.

Para las muestras de harina de trigo fortificada se empleó la norma cubana NC-ISO 2171:2002: "Cereales y productos de cereales Determinación de cenizas". Se pesaron 5 g de la muestra en los crisoles y antes de la incineración se humedecieron con 2 mL de etanol. Se colocó el crisol a la entrada del horno con la puerta abierta y después que la muestra ardió se introdujo el crisol hacia el interior del horno a la temperatura de 900 °C por 2 horas.

Para las muestras de leche entera en polvo fortificada se empleó el método AOAC Método Oficial 930.30: "Cenizas de leche en polvo". Se pesó un 1 g de la muestra en los crisoles se incineró la muestra a 550 °C hasta que las cenizas tomaron un

color blanco, este proceso tardó aproximadamente 2 horas. Cuando la incineración se completó, se extrajo el crisol del horno, se enfrió durante unos minutos y se transfirió a la desecadora hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Cada análisis de muestra se realizó por triplicado.

Tratamiento y dilución cenizas

Al crisol frío se le añadió con pipeta y en la campana 2 mL de HCl(conc) para disolver las cenizas. Se evaporó en la campana, se enfrió y añadió 1mL de HCl(conc) y 3,5 mL de agua bidestilada y con un agitador de vidrio se disolvieron las cenizas en su totalidad, luego se pasó cuantitativamente el líquido a un matraz aforado de 50 mL y se volvió a lavar el crisol con agua bidestilada por dos o tres veces más, pasando los líquidos de lavado al matraz y posteriormente se llevó al aforo.

Cuantificación de hierro total

Para la muestra de harina de trigo fortificada se filtró la solución de cenizas, se tomó una alícuota de 5 mL y se colocó en un matraz de 25 mL y para la muestra de leche entera en polvo fortificada se filtró la solución de la misma y se tomó una alícuota de 10 mL y se colocó en un matraz de 25 mL.

Luego se desarrolló el color añadiendo estos reactivos en el siguiente orden:

- 1 mL de solución de hidroxilamina y se agitó.
- 5 mL de buffer de acetatos y se agitó.
- 2 mL de orto-fenantrolina y se agitó.

Se dejó en reposo entre 10 y 15 minutos y posteriormente se leyó a 510 nm.

Expresión de los resultados

Para la harina de trigo fortificada:

a) Expresado como mg Fe/kg de muestra:

$$c(Fe) = \frac{c*250}{M_0}$$

b) Expresado como mg de FeSO₄/kg de muestra:

$$c(FeSO_4) = \frac{c*(250)*(2,71)}{M_0}$$

Donde:

c = Concentración obtenida de la curva de calibración.

c = A * F siendo F el factor de la curva, $F = \frac{\sum c}{\sum A}$ A: Absorbancia de la muestra

de ensayo

M₀ = Masa de la porción de ensayo

250 = Factor de dilución

2,71 = Fracción másica (FeSO₄/Fe)

Para la leche entera en polvo fortificada:

a) $c(Fe) = \frac{c*125}{M_0}$

Donde:

c = Concentración obtenida de la curva de calibración.

M_o = Masa de la porción de ensayo

125 = Factor de dilución

2.2 Plan de verificación

Para la verificación del método de ensayo desarrollado se estudiaron las características de desempeño del método en cuanto a: linealidad, precisión y veracidad.

2.2.1 Linealidad

Para la comprobación de la linealidad del método se estudió una curva de calibración construida en un intervalo de concentración que comprende el 20 % de la concentración esperada para las matrices en estudio (harina de trigo fortificada y leche entera en polvo fortificada) como se muestra en la tabla 2: "Volúmenes de la solución de trabajo de hierro y concentraciones de hierro en la solución". Para el estudio de la linealidad se calculó la ecuación de la curva y se representó gráficamente. Se calculó el coeficiente de correlación y determinación y se realizó test de significación de "r". Se llevaron a cabo además los test de significación de la pendiente y el intercepto. Por último, se obtuvo el gráfico de residuales.

2.2.2 Precisión

2.2.2.1 Precisión por repetibilidad

Se estimó la repetibilidad obteniendo seis réplicas proviniendo de porciones de ensayo idénticas en el mismo laboratorio, obtenidas por el mismo analista en un corto intervalo de tiempo. Este procedimiento se repitió para ambas matrices de estudio (harina de trigo fortificada y leche entera en polvo fortificada). Se calculó la desviación típica después de haber aplicado la dócima de Grubbs para los valores extremos. Se calculó el coeficiente de variación (RSDr en porcentaje), el criterio de aceptación para este parámetro se consideró como valor máximo 5,3 % según se define en la NC –TS: 368-2010: “Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos”.

2.2.2.2 Precisión por reproducibilidad intermedia

Se realizó un diseño anidado de tres factores teniendo en cuenta: día, analista y equipo según se muestra en la figura 1:

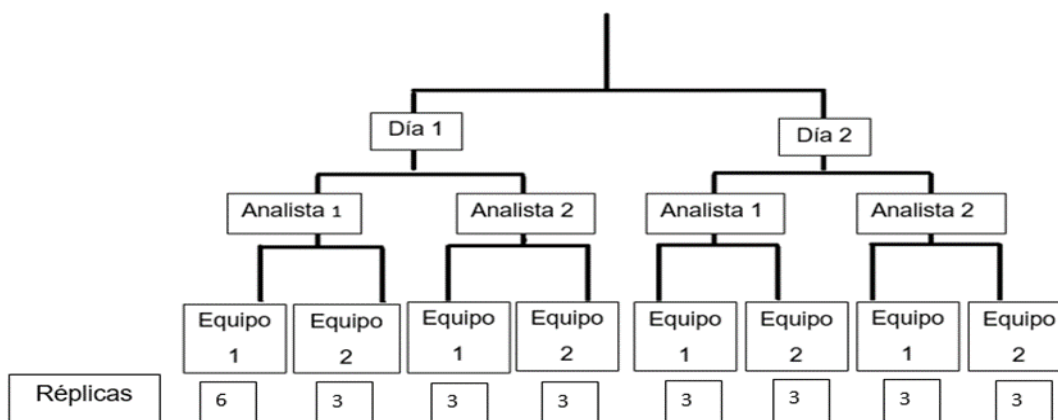


Figura1: Diseño anidado de tres factores

Se obtuvieron un total de 27 réplicas para cada una de las matrices en estudio (harina de trigo fortificada y leche entera en polvo fortificada). Se calculó la desviación típica después de haber aplicado la dócima de Grubbs para los valores extremos. Se calculó el coeficiente de variación (RSD_R en porcentaje), el criterio de aceptación para este parámetro se consideró como valor máximo 8 % según se define en la NC –TS: 368-2010: “Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos”.

2.2.3 Veracidad

Para el estudio de la veracidad se analizaron las mismas muestras utilizando el método en estudio y el método de determinación de hierro en absorción atómica empleado como método de referencia. Se realizaron en ambos casos diez réplicas. Se determinó el valor medio (\bar{x}) de los resultados obtenidos aplicando el método en estudio y se comparó con el valor de referencia (X_{ref}). Se efectuó un test de F de Fisher para la comparación de varianzas y test de t Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad $P = 0,05$.

2.3 Estimación de la incertidumbre de la medición

La incertidumbre de la medición se estimó utilizando los datos obtenidos en el estudio de validación intra- laboratorio. Para ello se utilizaron principalmente:

- La mejor estimación disponible de la precisión total.
- La mejor estimación(es) disponible del sesgo total y su incertidumbre.

- La cuantificación de cualquier incertidumbre asociada a efectos que no se han tenido lo suficientemente en cuenta en los estudios generales de rendimiento anteriormente mencionados.

Se estimó la precisión de manera que se produzcan variaciones naturales de todos los factores que afectan a los resultados. Se obtuvo la desviación estándar de los resultados de una muestra normal, analizada varias veces a lo largo de un periodo de tiempo (dos días), usando diferentes analistas (dos analistas) y equipos distintos (dos equipos).

Se obtuvo el sesgo del método bajo estudio (método espectrofotométrico UV-VIS) utilizando orto-fenantrolina por comparación de los resultados obtenidos con aquellos procedentes del método de referencia (Método de espectroscopia de absorción atómica). Si los resultados muestran que el sesgo es estadísticamente no significativo, se utiliza para la estimación de la incertidumbre del método, la incertidumbre estándar del método de referencia combinada con la incertidumbre estándar asociada a la diferencia entre métodos.

Se investigaron otras fuentes de incertidumbre como la debida a la no homogeneidad de la muestra para ello se analizaron seis muestras idénticas de leche entera en polvo fortificada y seis de harina de trigo fortificada contaminadas de forma natural en el mismo día.

Las incertidumbres de estas fuentes se combinaron utilizando este modelo:

$$u^2(y) = u^2(\delta_{\text{prod}}) + S_R^2 + \sum_{i=1}^n C_i^2 u^2(X_i)$$

Donde $u^2(y)$ es la incertidumbre al cuadrado del valor estimado; δ_{prod} es u^2 debida al sesgo del procedimiento; S_R^2 es la varianza de la reproducibilidad $\sum_{i=1}^n C_i^2 u^2(X_i)$ es la incertidumbre al cuadrado debido a efectos no incluidos en los restantes términos.

CAPÍTULO III:

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

CÁPITULO III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se muestran y analizan los principales resultados obtenidos en el proceso de verificación del método analítico diseñado para la cuantificación de hierro total en muestras de harina de trigo y leche entera en polvo fortificadas y además se estima la incertidumbre de la medición.

3.1 Informe de los resultados de la verificación

3.1.1 Linealidad

Para comprobar si la regresión es lineal se procedió a realizar un análisis estadístico apoyado en la construcción de la curva de regresión, el análisis de los residuos, la comprobación de la significación estadística de la correlación del intercepto y de la pendiente y límites de confianza del término independiente.

Tabla 3: Parámetros de linealidad

Parámetro	Valor calculado	Comparación con los criterios definidos
Ecuación de la recta	$y = 0,554x - 0,0015$	-
Representación gráfica	Ver anexo 2	No se muestran diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta.

Coeficiente de correlación	0,998	$r(6;0,001) = 0,925$ correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 %
Coeficiente de determinación	0,997	La variable independiente explica un 99,8 % de la varianza total de "y"
Test de significación de la pendiente	$b=0,554$ $S_b=0,01019665$ $t_{exp}=54,33$	$t_{exp} > t_{tab}$ para $P=0,001$ $54,331 > 5,959$ Indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es muy elevada, superior al 99,9 %
Test de significación del intercepto	$a = -0,0014683$ $S_a = 0,005335$ $t_{exp}=0,2752$	$t_{tab}=5,959$ para $P=0,001$ $t_{exp} < t_{tab}$ No hay razón suficiente para rechazar la hipótesis nula $a=0$ Existe una probabilidad elevada (99%) que la recta pase por el origen de coordenadas.
Límites de confianza del	$a \pm t. S_a$ $t_{tab}=5,959$ para $P=0,001$	Los límites del término independiente se encuentran entre -0,033 y 0,030 incluyen el

término independiente	L.I. = - 0,00147 +0,0318= 0,030 L.S.= - 0,00147 - 0,0318= - 0,033	cero, se cumple la condición de proporcionalidad, el método analítico no muestra un sesgo significativo.
Gráfico de residuales	Ver Anexo 3	Se observa una nube de puntos en dirección horizontal y con anchura constante.

Los resultados muestran un buen ajuste al modelo lineal de la curva de calibración en el intervalo de trabajo comprendido entre 0,1 a 1,0 µg de Fe/mL.

3.1.2 Precisión

3.1.2.1 Precisión por repetibilidad

Se realizó la comprobación de errores burdos a los datos experimentales obtenidos aplicando la dócima de Grubbs (ver Anexo 5). Resultados obtenidos en el experimento de repetibilidad y reproducibilidad intermedia (ver Anexo 8).

Tabla 4: Resultados de los análisis de repetibilidad

Muestras	S _r	RSD _r (%)	Comparación con criterio de aceptación
Leche entera en polvo fortificada	0,927	1,33	1,33 < 5,3 %

Harina de Trigo fortificada	0,975	1,02	1,02 < 5,3 %
--------------------------------	-------	------	--------------

3.1.2.2 Precisión por reproducibilidad intermedia

Se realizó la comprobación de errores burdos a los datos experimentales obtenidos aplicando la d6cima de Grubbs (ver Anexo 6).

Tabla 5: Resultados de reproducibilidad intermedia

Muestras	S_R	RSD_R (%)	Comparaci3n con criterio de aceptaci3n
Leche entera en polvo fortificada	2,129	3,14	3,14 < 8 %
Harina de Trigo fortificada	2,773	3,03	3.03 < 8 %

3.1.3 Veracidad

Se realiz3 la comprobaci3n de errores burdos a los datos experimentales obtenidos aplicando la d6cima de Grubbs (ver Anexo 7).

Tabla 6: Resultados de veracidad para muestras de leche entera en polvo fortificada.

Método	media (g de Fe/kg)	S	Prueba F	Prueba t
Espectroscopia UV-VIS	66,77	0,717	$F_{exp} = 0,799$ $F_{tab} = 3,18$ para $P = 0,05$ Se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas	$t_{exp} = 0,57$ $t_{tab} = 2,085$ para $P = 0,05$ $t_{exp} < t_{tab}$ El método analítico tiene la exactitud requerida
Espectroscopia Absorción Atómica	66,21	0,802		

Tabla 7: Resultados de veracidad para muestras de harina de trigo fortificada.

Método	media (mg de FeSO₄/kg)	S	Prueba F	Prueba t

Espectroscopia UV-VIS	96,17	1,902	$F_{exp} = 0,735$ $F_{tab} = 3,18$ para $P = 0,05$	$t_{exp} = 0,026$ $t_{tab} = 2,085$ para $P = 0,05$
Espectroscopia Absorción Atómica	96,10	2,216	Se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas	$t_{exp} < t_{tab}$ El método analítico tiene la exactitud requerida

3.2 Estimación de la incertidumbre usando estudios de validación intra-laboratorio

a) Estimación de la incertidumbre en la determinación de hierro total en leches enteras en polvo fortificadas mediante el método de espectrofotometría UV-VIS.

Tabla 8: Contribuciones a la incertidumbre de la medición.

Desviación estándar del experimento de precisión intermedia	$S_R = 5,12$ g de Fe/Kg
Desviación estándar asociada a la diferencia entre métodos	$S = 0,802$ g de Fe/Kg

Otras fuentes	No homogeneidad	S=0,549 g de Fe/Kg (ver Anexo 10)
	Variabilidad de la matriz	No se considera esta fuente pues esta estimación es solo aplicable a leche en polvo entera fortificada

Incertidumbre combinada:

$$u^2_c(y) = u^2(\delta_{\text{prod}}) + S_R^2 + \sum_{i=1}^n C_i^2 u^2(X_i)$$

$u_c = 2,276$ g de hierro /Kg de leche entera en polvo fortificada

Incertidumbre expandida:

$$U = K * u_c$$

$U = 4,55$ g de hierro/kg de leche entera en polvo fortificada, para $K=2$ con un nivel de confianza del 95 %

b) Estimación de la incertidumbre en la determinación de hierro total en harina de trigo fortificada mediante el método de espectrometría UV-Vis.

Tabla 9: Contribuciones a la incertidumbre de la medición

Harina de Trigo	Desviación estándar del experimento de precisión intermedia	$S_R = 3,29$
-----------------	---	--------------

	Desviación estándar asociada a la diferencia entre métodos	S= 2,21
Otras fuentes	No homogeneidad	S=0,491 g de Fe/Kg (ver Anexo 10)
	Variabilidad de la matriz	No se considera esta fuente pues esta estimación es solo aplicable a leche en polvo entera fortificada

Incertidumbre combinada:

$$u^2_c(y) = u^2(\delta_{\text{prod}}) + S_R^2 + \sum_{i=1}^n C_i^2 u^2(X_i)$$

$u_c = 3,96$ g de sulfato de hierro /kg harina de trigo fortificada

Incertidumbre expandida:

$$U = K \cdot u_c$$

$U = 7,92$ g de sulfato de hierro /kg harina de trigo fortificada, para $K=2$ con un nivel de confianza del 95 %

Conclusiones

- 1- Se diseñó un método de ensayo para la evaluación de la calidad de leche entera en polvo y harina de trigo fortificadas basado en el método de 1,10-fenantrolina (orto-fenantrolina), que reacciona con el Fe^{2+} para formar una entidad de coordinación de color rojo-naranja medida a una longitud de onda de 510 nm por espectrofotometría UV-Vis.
- 2- Se efectuó una verificación del método diseñado por ser reconocido en varias normas internacionales, cuyos resultados mostraron que en las matrices leche entera en polvo y harina de trigo fortificadas con hierro cumplen con el protocolo de verificación definido.
- 3- Se estimó la incertidumbre expandida de los resultados en los rangos de trabajo para $K=2$ con un nivel de confianza del 95 % para la leche entera en polvo fortificada y la harina de trigo fortificada, que serán usados en la expresión de los resultados en el análisis de rutina.

Recomendaciones

1. Continuar el estudio de validación del método mediante la evaluación de otras características de desempeño como la robustez y selectividad.
2. Evaluar la calidad del proceso de fortificación en las producciones de leche entera en polvo fortificada y harina de trigo fortificada mediante la aplicación de esta metodología analítica.
3. Este método de ensayo puede ser extendido a otros laboratorios analíticos dedicados al análisis de alimentos.
4. La técnica analítica implementada puede ser extendida al análisis de otras matrices de alimentos, previa verificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rozo, C., *FORTIFICACIÓN DE ALIMENTOS. Principios básicos y estado del arte de la fortificación de alimentos*. 2010.
2. Suárez, A.R., *ANÁLISIS DE SITUACIÓN DE PAÍS PARA LA FORTIFICACIÓN DEL ARROZ: CUBA* 1016.
3. (ACTA), a.C.d.C.y.T.d.A., *Codex Alimentarius. FORTIFICACIÓN DE ALIMENTOS Principios básicos y estado del arte de la fortificación de alimentos*. 2015.
4. Angélica Maria Serpa Guerra, L.M.V.A., Jaime Alejandro Barajas Gamboa, Cristina Isabel Castro Herazo y Robin Zuluaga Gallego*, *Compuestos de hierro para la fortificación de alimentos: El desarrollo de una estrategia nutricional indispensable para países en vía de desarrollo. – Una revisión* 2016.
5. Agricultura, O.d.l.N.U.p.l.A.y.l., *Guías para la fortificación de alimentos con micronutrientes* 2020.
6. Martínez, C., *Biodisponibilidad del hierro de los alimentos*. 1999.
7. RENE, H.C., *VERIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN LA HARINA DE TRIGO FORTIFICADA* 2017
8. YANA, E.C., *DETERMINACIÓN DE HIERRO Y METALES PESADOS EN HARINAS FORTIFICADAS PARA EVALUAR SU CALIDAD E INOCUIDAD* 2015
9. GRÍO, S.L., *DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DEL HIERRO EN ALGUNAS LEGUMINOSAS ANTES Y DESPUÉS DE SU TRATAMIENTO TÉRMICO USANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE UV-VISIBLE PREVIA COMPLEJACIÓN DE HIERRO CON O-FENANTROLINA*. 2012: .
10. Padrón, M., *intervenciones alimentarias y nutricionales en cuba: combatiendo la deficiencia de micronutrientes*. 2003.
11. 2012, N.T., *Harina de trigo- Especificaciones*. 2012.
12. Moreno Gordon Luisa Fernanda, V.O.L.F., *Determinación de hierro en alimentos por espectroscopía de Ultravioleta - Visible* 2016.
13. VILLEGAS, E.J.P. and M.B.T. JULIO, *VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO(Fe) TOTAL Y MANGANESO (Mn) EN AGUA POTABLE, NATURAL Y RESIDUAL POR ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA* 2020
14. Solórzano³, M.E.J.H.A.d.l.M.G.E.H.X.P., *Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES)*. 2020.
15. research, A.i., *Fundamentos de Espectroscopia Atómica: Hardware*. 2016.
16. MACHACA, A.K.G., *DETERMINACIÓN DE HIERRO EN AGUAS DEL SECTOR SUR DEL LAGO TITICACA (PARTE DEL SISTEMA TDPS) MEDIANTE LA FORMACIÓN DE COMPLEJO, UTILIZANDO LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA* 2014.
17. Ramos, A.R., *Evaluación de los parámetros de desempeño de validación para la determinación de hierro utilizando espectroscopía UV-Vis*. 2018.
18. Marcos, V.B., *Determinación de Fe 2+y Fe total en muestras de agua fluvial de la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro – Sosa*. 2018
19. Ceibas, L., *Determinación De Hierro (METODO FENANTROLINA) SM 3500-FE B* 2020.

20. Álvaro de Jesús Arango Ruiz², C.M.V.A., Yamilé Jaramillo Garcés^{4*}, María Adelaida Valencia Rojas⁵, Ángela Hernández Sierra⁶, *Cuantificación de hierro ferroso en espinaca y harina fortificada: una aplicación para la industria de panificación*¹. 2012.
21. Gutiérrez, R.J.L.M.e.I.H., *LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS: UN ENFOQUE PRÁCTICO* 2004.
22. Eurachem, G., *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados* 2016.
23. 2010, N.T.-. *GUÍA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO QUÍMICOS PARA ALIMENTOS* 2010.
24. acreditación(OAA), O.a.d., *GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO* 2019.
25. 896, N.T., *Directrices sobre la terminología analítica*. 2012
26. Novales, A., *Análisis de regresión lineal*. Vol. 18. 2010.
27. cels, M.c., *validación de métodos analíticos*. 2000.
28. José N. Díaz Caraballo, *Mate 3026 Estadística con Programación* 2005
29. Croffi, L., *MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA LA VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS*. 2018.
30. 2012, N., *DIRECTRICES SOBRE LA INCERTIDUMBRE EN LA MEDICIÓN*. 2012.
31. Herrera, J., *Validación y estimación de incertidumbre de un método analítico para cuantificar hierro total por el método colorimétrico de la fenantrolina en agua potable y natural*. Revista Científica de FAREM-Estelí, 2020(34): p. 154-168.
32. Valdéz, T., *estimacion de la incertidumbre debido al efecto de matriz mediante clasificacion de materiales*. 2008.
33. Alemán Molina, M.d.S. and O.A. Rodríguez Villavicencio, *Estudio comparativo de dos métodos potenciométricos para la determinación de hierro en tabletas y evaluación de sus incertidumbres*. 2008.
34. Martínez, W.A.S.y.R.J.L., *GUÍA PARA ESTIMAR LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN*. 2000.
35. CITAC, G.C.E., *Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas* 2012.

Anexos

Anexo 1

Tabla 10: Curva de calibración.

Volumen de la solución de trabajo de hierro de 0,005mg/mL	Concentración de hierro en la solución de comparación para fotometría	Absorbancia Réplica 1	Absorbancia Réplica 2	Absorbancia promedio
mL	µg/mL	UA	UA	UA
0	0	0	0	0
1,0	0,1	0,063	0,059	0,061
2,0	0,2	0,13	0,1	0,115
3,0	0,3	0,156	0,158	0,157
4,0	0,4	0,205	0,205	0,205
5,0	0,5	0,281	0,282	0,282
8,0	0,8	0,436	0,434	0,435
10,0	1	0,555	0,566	0,561

Anexo 2

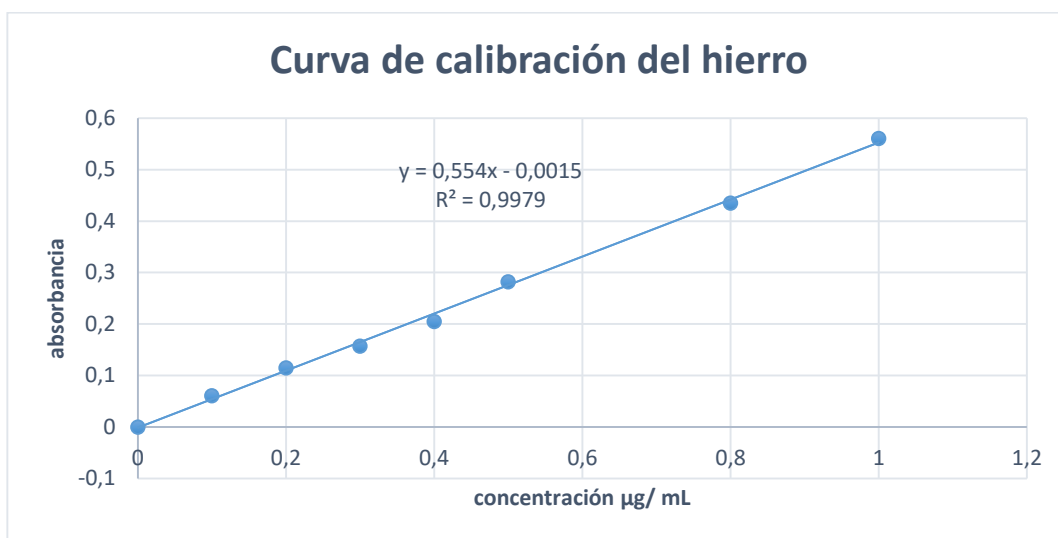


Figura 2: Curva de calibración del hierro

Anexo 3

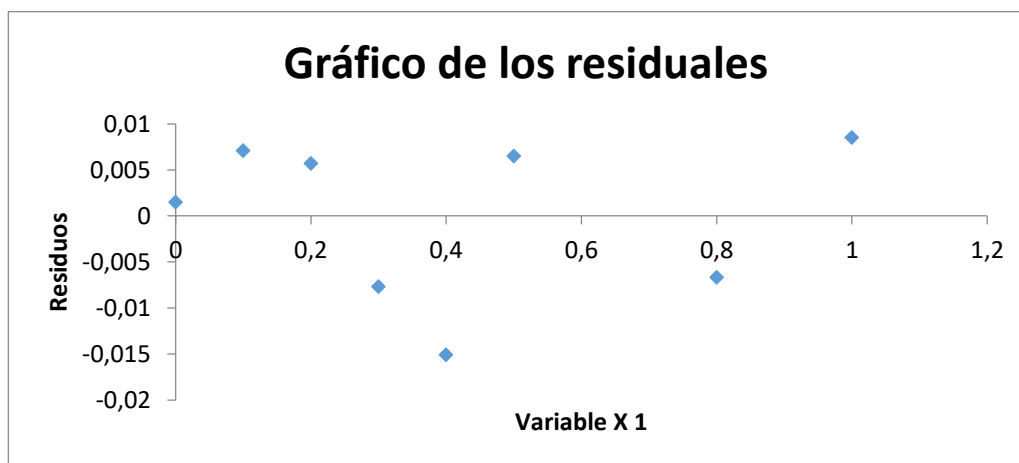


Figura 3: Gráfico de residuales

Anexo 4

Tabla 11: Datos estadísticos de linealidad.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,998983646
Coefficiente de determinación R ²	0,997968324
R ² ajustado	0,997629712
Error típico	0,009282593
Observaciones	8

Análisis de Varianza

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,25395238	0,25395238	2947,22 723	2,6227E-09
Residuos	6	0,000517	8,6167E-05		
Total	7	0,25446938			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-0,001468326	0,005335	-0,27522495	0,79237578	-0,01452261	0,01158595
Variable X 1	0,553559578	0,01019665	54,288371	2,6227E-09	0,52860927	0,57850988

Anexo 5

Tabla 12: Prueba de Grubbs para los ítems obtenidos en el experimento de precisión por repetibilidad.

Experimento de repetibilidad	Estadígrafos para la dcima de Grubbs	Valor critico 1 % para n=6	Valor critico 5 % para n=6	Aceptación o rechazo
leche entera en polvo fortificada	$G_{\min} = 1,880$	1,973	1,887	Estadígrafos menores a los valores crítico, ítems correctos
	$G_{\max} = 0,626$			
harina de trigo fortificada	$G_{\min} = 1,50$	1,973	1,887	Estadígrafos menores a los valores crítico, ítems correctos
	$G_{\max} = 1,33$			

Anexo 6

Tabla 13: Prueba de Grubbs para los ítems obtenidos en el experimento de precisión por reproducibilidad intermedia.

Experimento de reproducibilidad intermedia	Estadígrafos para la dcima de Grubbs	Valor critico 1 % para n=27	Valor critico 5 % para n=27	Aceptación o rechazo
leche entera en polvo fortificada	$G_{min} = 1,45$	3,13	2,82	Estadígrafos menores a los valores crítico, ítems correctos
	$G_{max} = 1,11$			
harina de trigo fortificada	$G_{min} = 1,15$	3,13	2,82	Estadígrafos menores a los valores crítico, ítems correctos
	$G_{max} = 1,84$			

Anexo 7

Tabla 14: Prueba de Grubbs para los ítems obtenidos en el experimento de veracidad.

Método	Experimento de veracidad	Estadígrafos para la dócima de Grubbs	Valor critico 1 % para n=10	Valor critico 5 % para n=10	Aceptación o rechazo
Absorción Atómica Ultravioleta Visible	Leche en polvo fortificada	$G_{\min}= 1,89$	2,482	2,290	Estadígrafos menores a los valores crítico, ítems correctos
		$G_{\max}= 0,47$			
		$G_{\min}= 1,03$			
		$G_{\max}= 0,25$			
Absorción Atómica Ultravioleta Visible	Harina de trigo fortificada	$G_{\min}= 0,55$	2,482	2,290	Estadígrafos menores a los valores crítico, ítems correctos
		$G_{\max}= 2,23$			
		$G_{\min}= 1,53$			
		$G_{\max}= 1,37$			

Anexo 8

Tabla 15: Datos de la reproducibilidad intermedia para muestras de leche entera en polvo fortificada.

			Absorbancia	c (Fe) ($\mu\text{g/mL}$)	c (Fe) (mg/kg)
Día 1	Analista 1	Equipo 1	0,301	0,560	69,98
			0,302	0,562	70,21
			0,298	0,554	69,28
			0,292	0,543	67,89
			0,302	0,562	70,21
			0,302	0,562	70,21
	Equipo 2	0,134	0,560	70,01	
		0,128	0,535	66,88	
		0,129	0,539	67,40	
	Analista 2	Equipo 1	0,289	0,538	67,19
			0,301	0,560	69,98
			0,302	0,562	70,21
		Equipo 2	0,126	0,527	65,83
			0,125	0,523	65,31
0,124			0,518	64,79	
			0,288	0,536	66,96

Día 2	Analista 1	Equipo 1	0,302	0,562	70,21
			0,280	0,521	65,10
		Equipo 2	0,124	0,518	64,79
			0,126	0,518	64,75
			0,128	0,535	66,88
	Analista 2	Equipo 1	0,229	0,556	69,51
			0,302	0,562	70,21
			0,301	0,560	69,98
		Equipo 2	0,126	0,527	65,83
			0,125	0,523	65,13
0,128	0,535	66,88			

Tabla 16: Datos de reproducibilidad intermedia para muestras de harina de trigo fortificada.

			Absorbancia	c (Fe) ($\mu\text{g/mL}$)	c (FeSO₄) (mg/kg)
	Analista 1	Equipo 1	0,372	0,692	93,75
			0,375	0,698	94,51
			0,377	0,701	95,01
			0,380	0,707	95,77
			0,376	0,699	94,76

Día 1			0,383	0,712	96,52
		Equipo 2	0,163	0,681	92,32
			0,161	0,673	91,18
			0,163	0,681	92,32
	Analista 2	Equipo 1	0,350	0,651	88,21
			0,348	0,647	87,70
			0,349	0,649	87,95
		Equipo 2	0,162	0,677	91,75
			0,161	0,673	91,18
			0,163	0,681	92,32
Día 2	Analista 1	Equipo 1	0,349	0,649	87,95
			0,348	0,647	87,70
			0,349	0,649	87,95
		Equipo 2	0,162	0,677	91,75
			0,164	0,686	92,88
			0,163	0,681	92,32
	Analista 2	Equipo 1	0,350	0,651	88,21
			0,349	0,649	87,95
			0,350	0,651	88,21
		Equipo 2	0,164	0,686	91,88
0,163			0,681	92,32	
0,163			0,681	92,32	

Anexo 9

Tabla 17: Datos de veracidad para muestras de leche entera en polvo fortificada.

Espectroscopia UV-Vis			Espectroscopia Absorción Atómica		
Absorbancia	c (Fe) ($\mu\text{g/mL}$)	c (Fe) (mg/kg)	Absorbancia	c (Fe) ($\mu\text{g/mL}$)	c(Fe) (mg/kg)
0,286	0,532	66,50	0,035	0,533	66,59
0,288	0,536	66,96	0,035	0,033	66,59
0,287	0,534	66,73	0,034	0,0517	64,69
0,288	0,536	66,96	0,035	0,0533	66,59
0,295	0,549	68,59	0,035	0,0533	66,59
0,285	0,530	66,26	0,035	0,0533	66,59
0,288	0,536	66,96	0,035	0,0533	66,59
0,286	0,532	66,50	0,035	0,0533	66,59
0,285	0,530	66,26	0,034	0,0517	64,69
0,284	0,528	66,03	0,035	0,0533	66,59

Tabla 18: Datos de veracidad para muestras de harina de trigo fortificada.

Espectroscopia UV-Vis			Espectroscopia Absorción Atómica		
Absorbancia	c (Fe) ($\mu\text{g/mL}$)	c(FeSO_4) (mg/kg)	Absorbancia	c(Fe) ($\mu\text{g/mL}$)	c (FeSO_4) (mg/kg)
0,392	0,729	98,79	0,048	0,730	98,99
0,385	0,716	97,03	0,047	0,715	96,92
0,377	0,701	95,01	0,046	0,700	94,86
0,379	0,704	95,51	0,046	0,700	94,86
0,388	0,721	97,78	0,046	0,700	94,86
0,389	0,723	98,03	0,046	0,700	94,86
0,387	0,719	97,53	0,046	0,700	94,86
0,373	0,693	94,00	0,046	0,700	94,86
0,370	0,688	93,25	0,046	0,700	94,86
0,376	0,699	94,76	0,049	0,745	101,053

Anexo 10

Tabla 19: Estudio de homogeneidad de las muestras

Leche entera en polvo fortificada	Harina de trigo fortificada
c(Fe) (mg/kg)	c(FeSO₄) (mg/kg)
66,96	88,34
66,20	88,78
66,60	89,34
66,60	89,76
66,32	88,85
66,88	88,90