

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE FRACCIÓN
DE MASA DE HIERRO EN HARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA”**

Postulante: Univ. Nilda Elizabeth Mamani Campos

Tutor: Dr. Rigoberto Choque Aspiazu

Cotutor: Lic. José Luis Gonzales Quino

**La Paz –Bolivia
2024**

DEDICATORIA

El presente trabajo de grado es dedicado primeramente a Dios, mi amado Padre por acompañarme, por haberme dado la vida, por no abandonarme y estar siempre a mi lado.

Honrosamente a mis amados padres y hermanos; que gracias a su apoyo y sus sacrificios tengo una carrera profesional. Con todo el amor a mi papá Ariel y mamá María. Mis hermanos Wendy, Ronald y Kevin.

Con todo el amor a mi esposo Álvaro Rubén Luna Mercado por estar conmigo y A mi Hijo Milan Joseph Luna Mamani por ser mi razón de continuar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios mi padre y creador mi guía, fortaleza y esperanza. Le agradezco siempre por acompañarme, y ayudarme, por bendecirme en la vida poniendo personas maravillosas que han estado a mi lado.

A mis padres por todo su apoyo y sacrificio por amor Ariel y María quienes han sido tolerantes conmigo, y me capacitaron para no rendirme.

A Álvaro Rubén mi esposo, compañero de vida y amigo; quien me impulso y levanto mi ánimo durante la etapa del proyecto y a mi Hijo Milan Joseph; por ser mi motivación en defender, porque en la trayectoria de aprendizaje y conocimientos él es mi fortaleza y mayor bendición.

Le agradezco a mi Docente, tutor y Amigo Dr. Rigoberto Choque Aspiazu por darme todo su apoyo, comprensión, tiempo, y por enseñarme e impartir desafíos en la trayectoria de mi formación.

De manera muy especial a mi Cotutor Lic. Jose Luis Gonzales Quino Supervisor de IBMETRO, por darme la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales y realizar un trabajo de grado en el Instituto Boliviano de Metrología, el cual hoy puedo defender; por brindarme todo su apoyo y respaldo, por enseñarme de sus conocimientos.

Le Agradezco a mi tribunal Dra. Sulema Valdez, por sus observaciones, su aporte y todo su apoyo en la revisión de este trabajo, por su comprensión y enseñanza.

Agradecida a mi Docente de la materia de prácticas Profesionales Dr. Oswaldo Ramos por impartir su conocimiento y experiencia en la culminación del trabajo.

A la Carrera de Ciencias Químicas por acogerme y darme la oportunidad de estudiar y egresar como profesional.

A todo el personal de la Unidad de Metrología Química, perteneciente al Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) por apoyarme, capacitarme y orientarme en todo el proceso de mi pasantía. Muchas gracias.

ACRONIMOS

NB: Norma Boliviana

IBNORCA: Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.

IBMETRO: Instituto Boliviano de Metrología.

DMIC: Dirección de Metrología Industrial y Científica.

UMQ: Unidad de Metrología Química.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

FAO: Food and Agriculture Organization

NIST: National Institute of Standards and Technology

LDM: Límite de Detección del Método

LQM: Límite de Cuantificación del Método

CV: Coeficiente de Variación

DS: Desviación Estándar

λ : Longitud de onda.

Fe²⁺: Ion Ferroso

Fe: Hierro

UV-VIS: Ultra Violeta Visible

EAA: Espectrometría de Absorción Atómica

PEAD: Polietileno de alta densidad.

SICAF: Sistema de Información de Control a Alimentos Fortificados

DS: Decreto Supremo

MINSAL: Ministerio de Salud –Gobierno de Chile

AGP: Ácidos Grasos poliinsaturados

AGS: Ácidos Grasos

AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

UI: Micro Litros

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la validación de un método para la determinación espectro métrica de Hierro en harinas, específicamente en muestras de harina de Trigo y harina de Quinoa. El principio de determinación se realiza por la técnica de absorción por espectrometría atómica. La solución extraída de la muestra de harina se realizó por el método de digestión por microondas en medio ácido, con ácido nítrico en concentración al 2%, a una longitud de onda de 248,33 nm.

Como proveedor de ensayos de aptitud, la Unidad de Metrología Química cumple con los requisitos de la Norma ISO 17043:2023 que en su acápite 6.1.3 indica cuando el ítem de EA sea un material que cumple con la definición de "material de referencia", debe producirse en condiciones que cumplan con los requisitos pertinentes de la Norma ISO 17034. Adicionalmente, la norma ISO 17034 en su acápite 7.7 Equipo de medición indica que el productor de material de referencia deberá garantizar que los equipos de medición utilizados en la producción de material de referencia se utilicen de conformidad con los requisitos pertinentes de la norma ISO/IEC 17025. Por lo que el presente proyecto de validación, cumple con todos los requerimientos de control y aseguramiento de calidad por la norma ISO/IEC 17025:2018, haciendo que IBMETRO cuente con un método validado para la medición de hierro en harinas fortificadas que serán empleadas como ítems de verificación para ensayos de aptitud. El método es sensible, con respuesta lineal de rango entre 0,14 mg/kg a 8 mg/kg y un rango de trabajo de 0,1 mg/kg a 1,8 mg/kg, con un $r^2 = 0,9995$ y límites de detección de 0,09, cuantificación de 0,16 mg/kg de Hierro, lo cual permite realizar su cuantificación.

Se verificó la precisión, selectividad y robustez del método analítico, determinando el contenido en muestras de harina, obteniendo buenos resultados presentes en el documento.

Palabras clave: Espectroscopia AA, Validación, Ensayo de aptitud, Material de referencia

INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	2
1.1.1. Legislación y normativa vigente.....	4
1.1.2. Control y aseguramiento de calidad	6
1.1.3. Clasificación y designación de la harina de trigo, según Norma Boliviana NB-680	7
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
1.2.1. Identificación del problema	8
1.3. HIPOTESIS DEL MÉTODO	9
1.4. OBJETIVOS	9
1.4.1. Objetivo general	9
1.4.2. Objetivos específicos.....	9
1.5. JUSTIFICACION	9
CAPITULO II	11
2. FUNDAMENTO TEORICO.....	11
2.1. TRIGO	11
2.2. ESPECIE DE TRIGO	11
2.2.1. Composición nutricional.....	12
2.3. HARINAS COMPUESTAS.....	15
2.4. ESPECIFICIDAD DE LAS HARINAS Y MEZCLAS	16
2.5. QUINUA (<i>Chenopodium quínoa</i>).....	16

2.5.1.	Propiedades nutricionales de la quinua.....	17
2.6.	VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	18
2.6.1.	Adecuación al Uso de los métodos Analíticos.....	18
2.6.2.	Importancia de Validar un Método	21
2.7.	DESARROLLO DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	22
2.7.1.	Plan de Validación	22
2.7.2.	Selectividad	22
2.7.3.	Linealidad	23
2.7.4.	Límite de detección (LOD).....	25
2.7.5.	Límite de cuantificación (LOQ)	26
2.7.6.	Sensibilidad Analítica	26
2.7.7.	Intervalo de trabajo	26
2.7.8.	Selectividad	27
2.7.9.	Precisión	28
2.7.10.	Precisión Intermedia	28
2.7.11.	Repetibilidad.....	29
2.7.12.	Reproducibilidad	29
2.7.13.	Exactitud.....	30
2.7.14.	Veracidad	31
2.7.15.	Robustez	32
2.7.16.	Incertidumbre.....	35
2.7.16.1.	Incertidumbre Tipo A.....	35
2.7.16.2.	Incertidumbre Tipo B:	36
2.7.16.3.	Incertidumbre combinada	36

2.7.16.4. Incertidumbre expandida:	36
2.8. METODO ESPECTROFOTOMETRICO	37
2.9. FUNDAMENTOS DE EAA.....	37
2.9.1. Espectros de emisión atómica.....	38
2.9.2. Espectros de absorción atómica.....	38
2.10. Técnicas analíticas de espectroscopia de absorción atómica.	38
2.10.1. Interferencias	38
2.10.2. Métodos	39
CAPITULO III	40
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	40
3.1. INSTRUMENTOS Y SISTEMAS DE MEDICIÓN.....	40
3.2. LIMPIEZA	42
3.3. MUESTRA	42
3.3.1. Descripción de la harina de trigo:	42
3.3.2. Descripción de la harina de Quinoa:.....	43
3.3.3. Descripción de harina del NIST	44
3.3.4. Tratamiento previo.....	45
3.4. DIGESTIÓN DE LA MUESTRA.....	45
3.5. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	47
3.5.1. Determinación de la fracción en masa de Fe por Espectrometría de Absorción Atómica	48
3.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	49
3.6.1. Procedimiento de Validación	49
3.6.1.1. Requisitos previos a tener en cuenta antes de la validación	49

3.6.1.2. Desarrollo del plan de validación	49
3.7. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	49
3.7.1. Determinación de la Linealidad.....	50
3.7.2. Determinación de Sensibilidad Analítica.....	51
3.7.3. Determinación de límite de detección y cuantificación.....	51
3.7.4. Determinación de selectividad.....	51
3.7.5. Determinación de precisión	52
3.7.6. Determinación de precisión intermedia	53
3.7.7. Determinación de reproducibilidad	53
3.7.8. Determinación de Sesgo y Exactitud.....	53
3.7.9. Determinación de Robustez.....	53
3.7.10. Determinación de Incertidumbre	54
CAPITULO IV	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
4.1. Linealidad	63
4.2. Límite de detección, Cuantificación y Sensibilidad Analítica	64
4.3. Selectividad.....	66
4.4. Precisión.....	67
4.4.1. Repetibilidad.....	67
4.4.2. Reproducibilidad	72
4.5. Robustez.....	77
4.6. Sesgo e Incertidumbre.....	80
CAPITULO V	89
5. CONCLUSIONES	89

CAPITULO VI 91

6. RECOMENDACIONES 91

CAPITULO VII..... 92

7. BIBLIOGRAFIA..... 92

ANEXOS..... 94

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Consumo de la harina de trigo	4
TABLA 2. Composición de la premezcla de micronutrientes	5
TABLA 3. Niveles mínimos de micronutrientes en la harina de trigo y mezclas a base de harinas de trigo	5
TABLA 4. Criterios de calidad de la harina de trigo y mezclas a base de harina de trigo fortificada	6
TABLA 5. Aporte nutricional de la harina trigo en 100 g	15
TABLA 6. Comparación de la composición química de quinua y otros cereales (g/100 g)	17
TABLA 7. Composición nutricional por cada 100 g/Quinua	18
TABLA 8. Prueba de robustez de Youden y Steiner	34
TABLA 9. Materiales utilizados	41
TABLA 10. Equipos utilizados	41
TABLA 11. Reactivos utilizados	41
TABLA 12. Valores de parámetros de harina de trigo MRC 125	43
TABLA 13. Valor de parámetros de harina de Quinua MRC 108	44
TABLA 14. Certificación de harina de soya NIST SRM 3234	45
TABLA 15. Preparación de la curva de calibración	47
TABLA 16. Condiciones de la operación del Equipo EAA	48
TABLA 17. Parámetros de validación	50
TABLA 18. Condiciones ambientales promedio del procedimiento.	55
TABLA 19. Preparación de solución de trabajo de Fe	56
TABLA 20. Preparación de las diluciones de trabajo	56
TABLA 21. Datos experimentales de Absorbancia de Diluciones de Fe estándar NIST.	57
TABLA 22. Condiciones ambientales de trabajo	59
TABLA 23. Representación de preparación de la muestra de harina de trigo	59
TABLA 24. Preparación de la muestra digerida	60
TABLA 25. Resumen del procedimiento de digestión de muestras	60
TABLA 26. Preparación de la muestra sin adición	61
TABLA 27. Preparación de la muestra con adición	61
TABLA 28. Determinación de Humedad	63
TABLA 29. Resumen de resultados	65
TABLA 30. Resultados del factor de recuperación en la muestra digerida	67
TABLA 31. Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad de Fe (mg/kg)	69
TABLA 32. Determinación de la desviación estándar y coeficiente de varianza	69
TABLA 33. Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad de Fe (mg/kg)	69
TABLA 34. Determinación de la desviación estándar y el coeficiente de varianza	70
TABLA 35. Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad de Fe (mg/kg)	70
TABLA 36. Determinación de la desviación estándar y el coeficiente de varianza	70
TABLA 37. Desarrollo del criterio de validación	71
TABLA 38. Determinación de la reproducibilidad interna harina de trigo	73
TABLA 39. Determinación del coeficiente de reproducibilidad interna	73
TABLA 40. Determinación de la reproducibilidad interna harina de quinua	74

TABLA 41. Determinación del coeficiente de reproducibilidad interna.....	74
TABLA 42. Determinación de la desviación estándar de reproducibilidad interna para el nivel de concentración de harina Certificada NIST	75
TABLA 43. Determinación del coeficiente de reproducibilidad interna.....	75
TABLA 44. Determinación de la desviación estándar de reproducibilidad interna	76
TABLA 45. Criterio de validación.....	77
TABLA 46. Diseño experimental de Youden Steiner	77
TABLA 47. Variables en el análisis de Fe en la harina.....	78
TABLA 48. Resultados obtenidos del estudio de Robustez	78
TABLA 49. Criterio de aceptación para el estudio de Robustez	79
TABLA 50. Estimación de incertidumbre	80
TABLA 51. Incertidumbre con respecto al material de referencia	81
TABLA 52. Contribución de fuentes de incertidumbre en %.....	81
TABLA 53. Presupuesto de incertidumbre	82
TABLA 54. Incertidumbre Expandida.....	83
TABLA 55. Contribución de fuentes de incertidumbre	83
TABLA 56. Contribución de fuentes de incertidumbre	83
TABLA 57. Método de Kratgen o Método numérico de estimación de incertidumbre.....	84
TABLA 58. Presupuesto de Incertidumbre	85
TABLA 59. Incertidumbre Expandida.....	86
TABLA 60. Método de Kratgen o Método numérico de estimación de incertidumbre.....	86
TABLA 61. Incertidumbre con respecto al material de referencia	87
TABLA 62. Contribución de la incertidumbre en la medición de Fe en Harina de trigo	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes del trigo	12
Figura 2 Curva de calibración, Concentración vs Respuesta	23
Figura 3. ‘Intervalo de trabajo’, ‘Intervalo lineal’, ‘	27
Figura 4. Precisión y Veracidad.....	28
Figura 5. Rampa de Digestión por el método de microondas	46
Figura 8. Curva de calibración de Fe respecto al rango de trabajo	58
Figura 9. Curva de calibración de Fe respecto al rango lineal	58
Figura 10. Contribución de fuentes de incertidumbre.....	82
Figura 11. Contribución de fuentes de incertidumbre	85
Figura 12. Contribución de la incertidumbre en la medición de Fe en Harina de trigo	87

ANEXOS

ANEXO 1. Instructivo propuesto para IBMETRO de determinación de Hierro en Harinas ...	94
ANEXO 2. Certificados de calibración Termohigrobarómetro-calibración de Temperatura ...	98
ANEXO 3. Certificado de Calibración de Humedad.....	98
ANEXO 4. Certificado de Calibración de presión	98
ANEXO 5. Certificado de calibración de la balanza	99
ANEXO 6. Plan de validación.....	100
ANEXO 7. Análisis de residuales.....	105
ANEXO 8. Datos de muestras digeridas para el parámetro de selectividad.....	106

ANEXO 9. Modelo de iteración para el parámetro de repetibilidad	107
ANEXO 10. Símbolos y abreviaciones	107
ANEXO 11. Certificado de estancia en IBMETRO	108

ARCHIVO FOTOGRÁFICO

Archivo fotográfico 1. Limpieza de tubos de digestión	109
Archivo fotográfico 2. Pesada de tubos de digestión	109
Archivo fotográfico 3. Preparación de la muestra digerida	109
Archivo fotográfico 4. Horno de Digestión	110
Archivo fotográfico 5. Muestras preparadas para determinación de Hierro.....	110
Archivo fotográfico 6. Muestras madre.....	110
Archivo fotográfico 7. Medición en el equipo EAA	111

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

El hierro que contienen los alimentos varía según su origen, en el caso de origen animal (cárnico) se encuentra en forma hémico (Hierro hemo) con una tasa de absorción entre 15 a 35 %. Por otro lado, los vegetales contienen concentraciones elevadas de hierro, incluso mayores a los alimentos a base de carnes, pero su biodisponibilidad es bastante menor, fluctuando entre 3 a 8 % dependiendo de la presencia de factores que favorezcan su absorción, Específicamente para el control de calidad de las harinas, los micronutrientes se pueden determinar por métodos como fluorimetría para las vitaminas B1 y B2, HPLC para identificar niacina y espectrometría de absorción atómica para la identificación de Hierro.

El Laboratorio de Química Inorgánica, dependiente de la Unidad de Metrología Química (UMQ) y parte de los Laboratorios de la Dirección de Metrología Industrial y Científica (DMIC) del Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO), requiere contar con un método validado para la determinación de hierro, Fe, en harinas para ser empleado en ensayos químicos para la caracterización de Materiales de Referencia, así como en la implementación de Ensayos de Aptitud de harinas.

El Reglamento de fortificación y enriquecimiento de la harina de trigo es para la prevención de anemias nutricionales, cuyo objetivo es establecer la obligatoriedad de la fortificación y el enriquecimiento con hierro, ácido fólico y vitaminas de complejo B, de todas las harinas de trigo de producción local, importadas y donadas que se consuman o comercialicen en el país, en forma primaria o como parte de productos elaborados, para poder contribuir a disminuir la morbimortalidad de los grupos poblacionales más vulnerables como son los niños y las mujeres embarazadas.

En el caso de Bolivia, se establece la norma NB 680 Harina y Derivados – Harina de Trigo – Requisitos, que fue elaborada con el objetivo de cumplir las directrices del Codex Alimentarius la cual indica que el contenido mínimo de hierro en harinas fortificadas debe ser de 30 mg/kg.

En el año 2011 el Ministerio de Salud presenta una ley acerca de la legislación y reglamento de la harina fortificada. (Legislacion y reglamentacion de la harina , 2006)

El método a validar se optimiza bajo la Norma Boliviana NB 39017 Harina de trigo - Método instrumental - Determinación de hierro y el método de análisis de la AOAC 985.35 “Minerals in Infant formula, enteral products, and pet Foods. Atomic Absorption Spectrophotometric Method”. Actualmente el IBMETRO cuenta con los equipos y materiales necesarios para la cuantificación de hierro en harina y tiene la capacidad de determinar los parámetros característicos del método para una validación, como la repetibilidad, reproducibilidad interna, sesgo, rango lineal, rango de trabajo, límite de detección, robustez, límite de cuantificación e incertidumbre. Estos parámetros serán evaluados empleando 3 materiales de referencia de matriz, uno certificado por el NIST y dos certificados por el IBMETRO mediante ensayos de aptitud.

1.1. ANTECEDENTES

En el año 2011, el Estado Plurinacional de Bolivia-Ministerio de Salud y Deportes, presenta una publicación (238) legislación y reglamentación de la harina de trigo y mezclas de harina y derivados fortificados, se realizó una evaluación del contenido de hierro y vitaminas del complejo “B” en la harina de trigo fortificada, como parte del “Sistema de Control de Calidad de los Alimentos Fortificados con Micronutrientes”, las cuales tuvieron un alcance en los departamentos de: Cochabamba, El Alto, La Paz, Oruro, Potosí, Santa Cruz y Sucre. Realizando análisis de hierro total en harinas de trigo fortificada, se verifico que las empresas molineras cumplieron en un porcentaje mayor al 50 % del total.

Se ha reconocido mundialmente la necesidad de asegurar el acceso de la población a los micronutrientes necesarios, un gran número de muertes de mujeres y niños pueden ser evitadas con medidas de bajo costo y alta efectividad. En Bolivia, la desnutrición y malnutrición por carencia de ciertos micronutrientes en la alimentación tienen diversas manifestaciones en enfermedades, siendo una de las principales causas de la morbilidad, mortalidad, incapacidad física y mental de las personas en general y de los niños en particular. Los efectos de la

deficiencia o ausencia de uno o más de los micronutrientes en la dieta se manifiestan no solo en el campo de la salud sino también afectan en la educación, producción y el desarrollo del País.

Por otra parte, los avances tecnológicos han puesto en nuestras manos soluciones simples y es obligación de cada gobierno garantizar a la población el acceso a una alimentación con niveles adecuados de nutrientes esenciales para la vida, asegurando de esta manera una calidad sanitaria y nutricional de los productos fortificados desde la producción hasta su consumo final, siendo uno de los aspectos más importantes el control de calidad analítico, que es fundamental porque garantiza los contenidos reglamentados de las sustancias fortificadas. Además, se debe contar con un programa efectivo de asistencia técnica a las industrias molineras, al personal de salud y de una amplia difusión del reglamento técnico de fortificación de la harina de trigo y mezclas en base a harina de trigo, cuyo propósito es establecer las cantidades suficientes de adición de sulfato ferroso anhidro y vitaminas del complejo B; de esta manera coadyuvar en la necesidad de facilitar el acceso a los micronutrientes a través de la harina de trigo fortificada.

En Bolivia, para la fortificación de alimentos con hierro se tomaron en cuenta los hábitos de consumo de la población, se realizó un cálculo de la demanda de harina de trigo y se determinó el nivel de consumo de sus derivados (pan y fideos) en algunas regiones, calculándose un consumo promedio de 40 kg/habitante/año, 110 a 130 g/día, y de acuerdo a la biodisponibilidad del compuesto de hierro utilizado, se espera alcanzar un aporte promedio de 6,2 mg de hierro, esto corresponde aproximadamente a un 60% de las recomendaciones promedio para la población en general. (Programa Nacional de Fortificación de Alimentos, 1996)

A nivel nacional, se estima un consumo de harina de 390.000 toneladas que, de acuerdo a la Legislación vigente, el 100% debería ser fortificado; en consecuencia, sólo se puede asegurar que la producción total nacional (175 000 ton/año) es fortificada basados en las cifras que se presentan en la **Tabla 1** (Fortificación De Harina De Trigo América Latina Y Región Del Caribe, 2004)

TABLA 1. Consumo de la harina de trigo

Producción Nacional	45%	175,500 t
Importaciones de Argentina	35%	136,500 t
Donaciones USA (antes del 2008)	8%	31,200 t
Contrabando	12%	46,800 t

Fuente: Fortificación de Harina de Trigo América Latina y Región del Caribe.

A nivel nacional, no se cuenta con informes actualizados ni evaluaciones, ni estudios en harinas de trigo fortificadas para su difusión a la población. Los SEDES y las alcaldías realizan controles de vigilancia en las industrias molineras y lugares de estipendio, estos datos se reportan de manera confidencial mediante el SICAF (Sistema de Información de Control a Alimentos Fortificados) los datos reportados están como Fe total y no como “Sulfato Ferroso”, el cual se encuentra en bajas concentraciones respecto a lo establecido por la Norma Boliviana NB - 680 (IBNORCA) (Entrevistas: INLASA, IBNORCA, EMAPA, Red de Micronutrientes , 2012)

1.1.1. Legislación y normativa vigente

En Bolivia, por Decreto Supremo N° 24420 del 26 de noviembre de 1996, se crea el Programa Integrado de Prevención y Control de las Anemias Nutricionales, y por Resolución Biministerial N° 008/97 el 27 de junio de 1997 se pone en vigencia el Reglamento Técnico referente a la fortificación de la harina de trigo con Fe para consumo humano. En las Tablas 2 y 3 se detalla la composición de micronutrientes en la harina de trigo y su mezcla según el Reglamento Técnico ya mencionado. (Reglamento Técnico de la Fortificación de la Harina de Trigo y Mezclas a Base de Harina de Trigo., 04 de Julio.)

TABLA 2. Composición de la premezcla de micronutrientes

MICRONUTRIENTE	FORMA (*)	NIVEL (mg/kg)	MINIMO
B1	Mononitrato de tiamina	4,4	
B2	Riboflavina	2,6	
NIACINA	Nicotinamida	35,6	
FOLATO	Ácido Fólico	1,5	
HIERRO	Sulfato Ferroso	30,00	
Fuente: NB-680 IBNORCA			
(*) :Nomenclatura FCC:FOOD CHEMICAL CODEX			

A partir de junio de 1999 en el marco del Programa Integrado de Prevención y Control de las Anemias Nutricionales y mediante Decreto Supremo 24420 de noviembre de 1996, se estableció que “la harina de trigo de consumo nacional debe ser fortificada con Fe y folato”, y delega a las Secretarías Nacionales de Salud y de Industria y Comercio la emisión del reglamento técnico (Resolución Bi-Ministerial N° 008/97).

TABLA 3. Niveles mínimos de micronutrientes en la harina de trigo y mezclas a base de harinas de trigo

MICRONUTRIENTE	FORMA (*)	NIVEL (mg/kg)	MINIMO
B1	Mononitrato de tiamina	4,4	
B2	Riboflavina	2,6	
NIACINA	Nicotinamida	35,6	
FOLATO	Ácido Fólico	1,5	
HIERRO	Sulfato Ferroso	30,00	
Fuente: NB-680 IBNORCA			
(*) :Nomenclatura FCC:FOOD CHEMICAL CODEX			

En la actualidad, la fortificación de harina de trigo forma parte del Programa Nacional de Fortificación de Alimentos que está inmerso en el Programa Desnutrición Cero del Ministerio de Salud y sus Unidades de Nutrición, que pretende reducir la prevalencia de anemias en el país en un 50 % hasta el 2010. El Gobierno Nacional reposicionó el Consejo Nacional de Alimentación y Nutrición (CONAN) a través de la promulgación del Decreto Supremo No. 28667 de 5 de abril de 2006 (Inicio del Programa Desnutrición Cero), cuyo objetivo es impulsar y coordinar la participación del sector público y sociedad civil para la formulación, difusión y seguimiento de las Políticas Sectorial de Alimentación y Nutrición, promueven la elaboración de la Política Nacional de Seguridad Alimentaria y Nutricional, orientada al ejercicio del Derecho Humano a la Alimentación Adecuada y la erradicación de la desnutrición- La fuente de Fe para la fortificación debe ser Sulfato Ferroso Anhidro FeSO_4 grado FCC (Food Chemical Codex).

1.1.2. Control y aseguramiento de calidad

La unidad de nutrición dependiente del Ministerio de Salud y Deportes Aplicara el sistema de Control de Calidad de alimentos fortificados para la verificación de los niveles de Fortificación, los cuales deberán ajustarse a los criterios de calidad que se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4. Criterios de calidad de la harina de trigo y mezclas a base de harina de trigo fortificada

NIVELES DE CONTROL	INDICADOR	NIVEL DE ADICIÓN (ppm)
Premezcla de micronutrientes (P)	Todos los nutrientes del Art. 4 de este reglamento	Art. 5 del reglamento
Producción (a y b)	Sulfato Ferroso Anhidro	≥ 30 ppm
Importaciones (c) Auditorias de calidad	Sulfato Ferroso Anhidro	≥ 30 ppm
Monitoreo (Sitios de Expendio) d	Sulfato Ferroso Anhidro	≥ 30 ppm
Fuente: Unidad de Nutrición. Ministerio de Salud y Deportes.		

- Premezcla de Micronutrientes – Producción: Verificación de la calidad de la premezcla mediante los certificados de calidad emitidos en origen y mediante análisis cuantitativos en laboratorios nacionales.
- Producción (a y b): Determinación cuantitativa en muestras combinadas de la producción de un día y almacén.
- (c) Importaciones: Determinación cuantitativa en muestras Individuales aleatorias. En el caso de las Auditorías de Calidad, el número total de muestras se obtendrá siguiendo criterios estadísticos de muestreo.
- (d) Monitoreo: Determinación cuantitativa en muestras individuales de cada marca existente en lugares de expendio.

1.1.3. Clasificación y designación de la harina de trigo, según Norma Boliviana NB-680

De la **NB-680** se consideran las siguientes definiciones:

- i. Harina para panificación: Es el producto definido en 2.2.1, que está de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 1 (NB-680), que puede ser tratada con aditivos permitidos y que debe ser fortificada con vitaminas y minerales, de acuerdo a la Tabla 3 de la NB-680
- ii. Harina para pastas y fideos: Es el producto definido en 2.2.1, que está de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 1 (NB-680), que puede ser tratada con aditivos permitidos y que debe ser fortificada con vitaminas y minerales, de acuerdo a la Tabla 3 de la NB-680
- iii. Harina para galletas: Es el producto definido en 2.2.1, que está de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 1 (NB-680), que puede ser tratada con aditivos permitidos y que debe ser fortificada con vitaminas y minerales, de acuerdo a la Tabla 3 de la NB-680
- iv. Harina integral: Es el producto resultante de la molienda del grano de trigo entero y limpio y que deberá ser fortificada con vitaminas y minerales de acuerdo a la Tabla 3 de la NB-680

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Será posible desarrollar y validar un método analítico de determinación de fracción de masa de Fe en harinas fortificadas para asignar valores de ítems de ensayo durante los ensayos de aptitud?

1.2.1. Identificación del problema

La Dirección Técnica de Acreditación (DTA) del IBMETRO en su criterio DTA-CRI-015 indica que el IBMETRO es uno de los proveedores de Ensayos de Aptitud aceptados para que los laboratorios puedan evaluar su desempeño.

Como proveedor de ensayos de aptitud, la Unidad de Metrología Química cumple con los requisitos de la norma ISO 17043:2023 que en su acápite 6.1.3 indica cuando el ítem de EA sea un material que cumple con la definición de "material de referencia", debe producirse en condiciones que cumplan con los requisitos pertinentes de la Norma ISO 17034.

Adicionalmente, la norma ISO 17034 en su acápite 7.7 Equipo de medición indica que el productor de material de referencia deberá garantizar que los equipos de medición utilizados en la elaboración de material de referencia se utilicen de conformidad con los requisitos pertinentes de la norma ISO/IEC 17025.

Actualmente el Laboratorio de Química Inorgánica en IBMETRO no cuenta con un método validado para la medición de Fe en harinas fortificadas que son empleadas como ítems de verificación para ensayos de aptitud; y un problema en Bolivia es que no se cuenta con suficientes laboratorios acreditados que puedan realizar un estudio confiable de los niveles de concentración de Fe en harinas fortificadas.

A partir de junio de 1999 en el marco del Programa Integrado de Prevención y Control de las Anemias Nutricionales y mediante Decreto Supremo 24420 de noviembre de 1996, se estableció que “la harina de trigo de consumo nacional debe ser fortificada con Fe y folato” con un nivel mínimo de Fe de 30,00 mg/kg; esto demuestra la necesidad de contar con métodos confiables y laboratorios competentes para la determinación de Fe en matrices de Harina.

Para asegurar la competencia de estos laboratorios es necesario que la Unidad de Metrología Química del IBMETRO, como organizador de ensayos de aptitud, implemente un método validado para la medición y asignación del valor de fracción en masa de Fe en muestras de harina fortificada que serán empleadas como ítem de ensayo. El desarrollo del presente trabajo pretende resolver este problema realizando el desarrollo y validación del método.

1.3. HIPOTESIS DEL MÉTODO

Se valida un método analítico para la determinación de Fe en Harinas fortificadas.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Validar el método de determinación de fracción en masa de Fe en harinas fortificadas por espectrometría de Absorción Atómica con sistema de atomización con flama.

1.4.2. Objetivos específicos

- i. Optimizar un método para la determinación de la fracción en masa de Fe en harinas con base en el método establecido por la Norma Boliviana NB 39017 y la AOAC 985.35.
- ii. Validar el método de determinación de la fracción en masa de Fe en Harinas Fortificadas por Espectrometría de Absorción Atómica cumpliendo los requisitos de validación definidos en la norma ISO/IEC 17025.

1.5. JUSTIFICACION

El Laboratorio de Química Inorgánica, perteneciente a la Unidad de Metrología Química (UMQ) que forma parte de los Laboratorios de la Dirección de Metrología Industrial y Científica (DMIC) en el Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO), Se requiere tener un método validado para la determinación de Fe en harinas porque son necesarios para asignar el valor de referencia para ensayos de aptitud de Fe en harinas fortificadas.

El método a validar está basado en la Norma NB 39017 y el método de análisis de la AOAC 985.35, ambos procedimientos normalizados son combinados. La validación del método permitirá al IBMETRO certificar material de referencia en vista de que este material es usado

en ensayos de aptitud. Los parámetros característicos de desempeño del método que serán considerados en la validación son la repetibilidad, reproducibilidad interna, sesgo, rango lineal, rango de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre. Estos parámetros se evaluarán realizando mediciones a 3 materiales de referencia, uno certificado por el NIST y dos certificados por el IBMETRO mediante ensayos de aptitud de gestiones pasadas.

Es de gran importancia realizar la validación del método analítico ya que permite confirmar y evidenciar que se cumplen los requisitos particulares para su uso previsto mediante fundamento estadístico y demostrar que la determinación de Fe es reproducible, confiable y que cumple los requisitos establecidos en la Norma Boliviana ISO/IEC 17025:2018.



CAPITULO II

2. FUNDAMENTO TEORICO

2.1. TRIGO

El trigo es una planta gramínea anual con espigas; es decir, se trata de una especie de pasto. El trigo es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana. En general no se consume directamente; se emplea en la elaboración de alimentos, sobre todo en la Industria de la panificación, así como en la fabricación de pastas, galletas, bebidas y hasta en la producción de combustibles.

Los problemas de seguridad alimentaria dependen de las políticas establecidas por cada gobierno; en este contexto, el Estado Plurinacional de Bolivia a través de EMAPA y las instituciones especializadas en el tema agrícola, reactivaron la producción de trigo, brindando apoyo a los productores nacionales, para luego comprar a precio justo. Como otros insumos se tiene los fortificantes que señala la Norma Boliviana para la harina producida localmente y de importación, tales como: Fe (Sulfato Ferroso), Tiamina (B1), Ácido Fólico, Riboflavina (B2) y Niacina. (BOLIVIA: AUTORIDAD DE FISCALIZACIÓN Y CONTROL SOCIAL DE EMPRESAS-AEMP., 2012)

2.2. ESPECIE DE TRIGO

La palabra trigo designa tanto a la planta como a sus semillas comestibles, tal y como ocurre con los nombres de otros cereales. El grano de trigo es utilizado para elaborar harina, harina integral, sémola, cerveza y una gran variedad de productos alimenticios. Las diferentes especies de trigo son *Triticum vulgare*, *Triticum aestivum* Lam = *Triticum aestivum* Lam Theii, *Triticum compactum* Host, *Triticum durum* Lin (BOLIVIA: AUTORIDAD DE FISCALIZACIÓN Y CONTROL SOCIAL DE EMPRESAS-AEMP., 2012)

Diagrama Esquemático del grano de Trigo

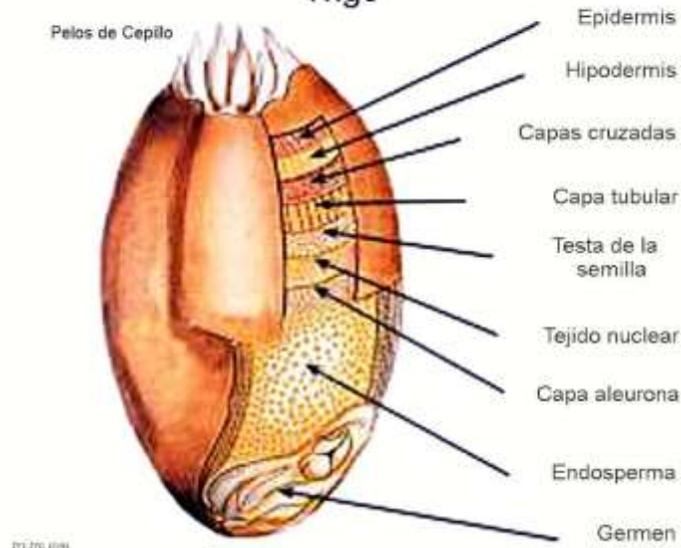


Figura 1. Partes del trigo

Fuente. Estudio De La Harina De Trigo (AS-AEMP. 2012)

2.2.1. Composición nutricional

En lo que se refiere al aporte nutricional, el trigo es un alimento con un importante aporte de:

- **Hidratos de carbono.** Aporte energético. Se estima que el 55-60 % de la energía diaria que necesitamos debe provenir de carbohidratos, bien por la ingesta de alimentos ricos en almidón, bien por las reservas de glucógeno presentes en nuestro organismo.
- **Fibra.** Ayuda a que se den en el organismo las condiciones favorables para la eliminación de determinadas sustancias nocivas como colesterol o ciertas sales biliares, y colabora en la disminución de glucosa y ácidos grasos en la sangre. Colabora además en la eliminación de agentes cancerígenos.
- **Magnesio.** Contribuye a mejorar tanto el tono muscular como el neuronal, favoreciendo la transmisión de los impulsos nerviosos, y la contracción y relajación de los músculos. Colabora en el reforzamiento del sistema óseo y la dentadura, e interviene en el sistema cardiovascular, ayudando a mantener estable el ritmo cardíaco y la presión arterial, protegiendo las paredes de los vasos sanguíneos y actuando como vasodilatador, evitando de esta manera la formación de coágulos. Además, aumenta la producción de

glóbulos blancos para beneficio del sistema inmunitario. Se estima que alrededor del 60 % del magnesio que asimilamos se distribuye en huesos y dientes, el 28 % en órganos y músculos, y el 2 % restante en líquidos corporales.

- **Vitamina B1 (o tiamina).** Participa en la producción energética colaborando en el metabolismo de los carbohidratos. La vitamina B1 juega además un papel esencial en la absorción de glucosa por parte del cerebro y sistema nervioso, por lo que la deficiencia de este nutriente puede derivar en cansancio, poca actividad mental, falta de coordinación, depresión, etc. Coadyuva a otras funciones como el crecimiento y mantenimiento de la piel o el sentido de la vista.
- **Vitamina B9 (o ácido fólico).** Contribuye a la formación de células sanguíneas y glóbulos rojos, ayudando a prevenir la anemia y a mantener sana la piel. Además de ser indispensable para la correcta división y crecimiento celular, fundamental durante el embarazo y la infancia, la vitamina B9 interviene en el metabolismo de proteínas, ADN y ARN, reduciendo el riesgo de aparición de deficiencias en el tubo neural del feto (estructura que dará lugar al sistema nervioso central).
- **Cinc.** Interviene en el proceso de formación de los huesos, así como en el desarrollo de los órganos reproductivos, favoreciendo el funcionamiento de la glándula prostática. El cinc, además de ser un poderoso antioxidante natural, favorece la absorción de vitamina A y la síntesis de proteínas como el colágeno, colabora en el adecuado crecimiento durante el embarazo, niñez y adolescencia, y ayuda al mantenimiento de los sentidos de la vista, el gusto y el olfato. Además de estar en los huesos, está presente en diferentes tejidos de nuestro organismo como músculos, testículos, cabellos, uñas y revestimientos oculares.
- **Fósforo.** Contribuye a la mejora de determinadas funciones de nuestro organismo como la formación y desarrollo de huesos y dientes, la secreción de leche materna, la división y metabolismo celular o la formación de tejidos musculares. La presencia de fósforo (en forma de fosfolípidos) en las membranas celulares del cerebro es fundamental, favoreciendo la comunicación entre sus células, mejorando de esta manera el rendimiento intelectual y la memoria.

- **Hierro.** Necesario para la síntesis de hemoglobina, colabora en la renovación de las células sanguíneas, posibilitando el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia los diferentes órganos, como los músculos, el hígado, el corazón o el cerebro, siendo el Fe indispensable en determinadas funciones de este último, como la capacidad de aprendizaje. El Fe también incrementa la resistencia ante enfermedades reforzando las defensas frente a los microorganismos, previene estados de fatiga o anemia, y sin él no podrían funcionar el sistema nervioso central, el control de la temperatura corporal o la glándula tiroides, siendo además saludable para la piel, el cabello y las uñas. Imprescindible para el organismo en situaciones de carencia de Fe, ya sean como consecuencia de hábitos alimenticios inadecuados, durante la menstruación o el embarazo, o tras accidentes u operaciones médicas donde se ha perdido sangre.
- **Vitamina B2 (o riboflavina).** Favorece la actividad oxigenadora intercelular, mejorando el estado de las células del sistema nervioso y colaborando en la regeneración de tejidos como piel, cabello, uñas y mucosas, y de forma especial en la integridad de la córnea, contribuyendo de esta manera a mejorar la salud visual. Esta vitamina interviene además en la transformación de los alimentos en energía, y complementa a la vitamina E en su actividad antioxidante, y a las vitaminas B3 y B6 en la producción de glóbulos rojos, ayudando a mantener el sistema inmune en buen estado.
- **Vitamina B3 (o niacina).** Interviene en el proceso de transformación de energía a partir de hidratos de carbono, proteínas y grasas, y contribuye a relajar los vasos sanguíneos dotándoles de elasticidad, a estabilizar los niveles de glucosa y ácidos grasos en la sangre, y a reducir el colesterol secretado por el hígado. Junto con otras vitaminas del complejo B, la niacina ayuda a mantener sanas piel y mucosas digestivas, además de colaborar en el buen estado del sistema nervioso.
- **Potasio.** Junto con el sodio, se encarga de regular el balance ácido-base y la concentración de agua en sangre y tejidos. Las concentraciones de estos dos elementos en el interior y exterior de las células de nuestro organismo, generan un potencial eléctrico que propicia las contracciones musculares y el impulso nervioso, con especial relevancia en la actividad cardíaca

- **Calcio.** Contribuye al fortalecimiento de huesos, dientes y encías, y favorece la adecuada coagulación de la sangre, previniendo enfermedades cardiovasculares, ya que el calcio ayuda a disminuir los niveles de colesterol en sangre. Ayuda también en la regulación de la frecuencia cardíaca y en la transmisión de impulsos nerviosos, contribuyendo a reducir la tensión arterial en personas con hipertensión. El calcio, además, mantiene la permeabilidad de las membranas celulares e interviene en el proceso de la actividad neuromuscular, entre otras funciones.

En la **Tabla 5** se detalla el aporte nutricional del grano de trigo presente en este alimento, ordenados por relevancia de su presencia, los mismos son: proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitamina D, yodo, vitamina C, agua, retinol, grasa, vitamina A, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos saturados, vitamina B12 y carotenoides.

TABLA 5. Aporte nutricional de la harina trigo en 100 g

Característica	Valor	Característica	Valor	Característica	Valor
Energía	295,57 kcal	Potasio	405,29 mg	Vit. A	75,74 µg
Proteínas	11,77 g	Fosforo	374,29 mg	Vit. B1	0,45 mg
Hidratos	49,16 g	Fibra	11,91 g	Vit. B2	0,30 mg
Agua	23,64 g	Grasa	3,11 g	Vit. B3	6,39 mg
Calcio	100,96 mg	Colesterol	0,00 mg	Vit. B6	0,40 mg
Hierro	4,04 mg	AGS	0,56 g	Vit. B9	101,09 µg
Yodo	5,29 µg	AGM	0,64 g	Vit. B12	0,16 µg
Magnesio	125,93 mg	AGP	1,29 g	Vit. C	3,74 mg
Cinc	3,34 mg	Carotenos	4,43 µg	Vit. D	0,44 µg
Selenio	26,41 µg	Retinol	75,00 µg	Vit. E	2,38 µg
Sodio	349,21 mg				

Fuente: Salud y Buenos Alimentos: Panorama Creativo

2.3. HARINAS COMPUESTAS

“De acuerdo a la Organización para la Agricultura y la Alimentación FAO, la solución a la falta de producción de trigo en algunos países abre las puertas a la necesidad de crear harinas

compuestas. La definición de harinas compuestas, de acuerdo con el concepto expresado en un principio por la FAO, se refiere a mezclas elaboradas para producir alimentos a base de trigo, como pan, pastas, y galletas”. (Elias, 1996)

El concepto de harinas compuestas ha cambiado, no solo para describir la harina de trigo mezclada con harinas de otros cereales y leguminosas, sino también de tubérculos, raíces y proteínas suplementarias. Incluyendo también la eliminación de la harina de trigo. (Elias, 1996)

2.4. ESPECIFICIDAD DE LAS HARINAS Y MEZCLAS

Se refiere a la caracterización de atributos o cualidades peculiares que presenta un producto, éstas permiten identificar su calidad y aplicabilidad. Para ello, se deben realizar diversas pruebas. Según la norma del Codex Alimentarius, (1995) para sémola y harina de trigo duro se debe cumplir con atributos de calidad: inocuas y apropiadas para el consumo humano, exenta de sabores y olores extraños, humedad del 14,5% como valor máximo. Además, es importante determinar el contenido de: cenizas, proteína, fibra, lípidos y carbohidratos., Igualmente su morfología, tamaño de partícula, permitirá una correlación entre las macroestructuras, microestructuras y sus propiedades funcionales. Esta caracterización permite analizar la influencia de los ingredientes y las condiciones de procesado en la estructura de los alimentos. (umaña , 2013).

2.5. QUINUA (*Chenopodium quínoa*)

La quinua es una importante fuente de alimento en la región andina desde el 3000 ac y ocupa un lugar de importancia en el imperio Inca. Es uno de los cultivos más antiguos del continente americano, jugó un papel importante en la dieta y la cultura de los habitantes andinos prehispánicos. Sin embargo, su producción fue casi completamente abandonada después de la conquista española (Rojas. et.al., 2011)

Es un grano nutritivo con alto contenido de proteína, en la Tabla 6 se comparan composiciones químicas de la quinua con otras especies como ser: trigo, arroz, maíz y cebada; los análisis de composición nutricional, lanzan resultados de proteína del 12 al 23 %. Debido a su diversidad

genética y potencial nutritivo, coadyuva a la seguridad alimentaria, la FAO lo considera como un cultivo prometedor para la humanidad. (Rojas. et.al., 2011).

El contenido de lisina en quinua es el doble que en los cereales como el trigo o el maíz. También presenta un apropiado perfil de aminoácidos para niños en edad preescolar ya que no muestra deficiencia de aminoácidos esenciales. Comúnmente, la cantidad de aminoácidos esenciales en la quinua es mayor que en los cereales comunes (Cervilla , 2016).

TABLA 6. Comparación de la composición química de quinua y otros cereales (g/100 g)

COMPONENTES	QUINUA	TRIGO	ARROZ	MAIZ
Humedad %	11,2	10,94	11,62	10,37
Cenizas	3,42	1,78	0,64	1,20
Proteínas	15,33	13,68	7,13	9,42
Lípidos	6,93	2,47	0,66	4,74
Carbohidratos	68,35	71,13	79,95	74,26

Fuente. (Zambrano et al., 2019) (Padrón et al., 2014)

2.5.1. Propiedades nutricionales de la quinua

La quinua se destaca por su concentración de nutrientes, todos beneficiosos para el organismo. Otra virtud que la diferencia es que se consume de forma integral, sin procesamiento. Posee un alto contenido de proteínas, que incluye a todos los aminoácidos esenciales que el cuerpo necesita. También aporta grasas de buena calidad (ácidos omegas 6 y 3) y fibra en su mayoría de tipo insoluble, como poseen característicamente las semillas. El consumo regular de quinua ayudará a proteger la salud cardiovascular de diferentes maneras:

- Colabora con la disminución del colesterol sanguíneo por su aporte de lípidos insaturados.
- Aporta bajo contenido de sodio, por lo que se recomendada también en la prevención y tratamiento de la hipertensión arterial.

- Su índice glucémico es bajo, recomendada para personas con resistencia a la insulina, diabetes y obesidad. El aporte de Fe vegetal es mayor al de la mayoría de los cereales; contiene 4,57 mg. de Fe/100 g de quinua cruda. Sin embargo, del mismo modo que todos los alimentos vegetales, contiene algunos componentes no nutritivos que pueden reducir el contenido y la absorción de sustancias minerales. De todas formas, la quinua es un alimento recomendable para aquellas personas que realizan dietas vegetarianas. También es fuente de folatos que previene los defectos en el tubo neural del bebé durante el periodo de embarazo. Por su importante aporte de fibra, logra combatir el estreñimiento. Además, como no contiene gluten, es un alimento apto para las personas con celiacía o intolerancia al gluten. En su estado natural, las semillas de quinua están cubiertas de una capa de resina jabonosa llamada “saponina”. Si la misma no se retira, genera un sabor amargo y espeso luego de la cocción. Por esto se recomienda realizar el lavado de la semilla, previo a su cocción. (Lic. Mariana Patrón Farias, 2019).

TABLA 7. Composición nutricional por cada 100 g/Quinua

COMPONENTES	Contenido /100 g de Harina
Energía	11,2 kcal
Proteína Total	3,42 g
Grasas Totales	15,33 g
Fibra	6,93 g
Calcio	68,35 mg
Hierro	4,57 mg
Magnesio	197 mg

Fuente. De Oliveira et al. (2006).

2.6. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

2.6.1. Adecuación al Uso de los métodos Analíticos

La validación de métodos es un requisito importante en el desarrollo de los análisis químicos.

La validación de los métodos analíticos en su desarrollo ha acompañado a la evolución de la química analítica, que son los que al definir contenidos mínimos o máximos requieren de métodos confiables, de igual manera, el desarrollo tecnológico ha contribuido al poder contar con métodos más precisos y específicos, por tanto, es necesario realizar una evaluación sistemática de su desempeño.

De la norma NB/ISO/IEC 17025:2018 se tiene que la validación es “La confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto”. Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico previsto.

La validación de los métodos debe realizarse en colaboración con otros laboratorios, sin embargo, no se realiza. Ahora bien, la norma ISO/IEC 17025 propone una serie de requisitos para laboratorios interesados en demostrar que están operando de acuerdo con los requerimientos establecidos, la ISO 15189 abarca todos los Aspectos de la gestión de calidad en laboratorios médicos, desde la fase inicial de planificación y diseño hasta la eliminación final de los residuos de laboratorio y la ISO 15195 establece los requisitos para la competencia de los laboratorios de calibración ayudan a clarificar este tema. Por ejemplo, la necesidad de demostrar que los métodos deben adecuarse a su uso previsto que se indica en la norma ISO/IEC 17025 en el apartado 5.4.2.

Realizar una validación de desempeño es un paso fundamental para determinar su precisión y fiabilidad para un propósito específico. Cuando un laboratorio realiza la validación de un método, lo que busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. (Guidelines for the nomination and submission of new, revised and , 2003).

Un método debe validarse conforme al apartado 7.2.2 Validación de métodos ISO/IEC 17028:2017 que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados (Norma ISO 17025).

La calibración o evaluación del sesgo y precisión utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;

- una evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;
- la robustez del método de ensayo a través de la variación de parámetros controlados, tales como la temperatura de la incubadora, el volumen suministrado;
- la comparación de los resultados obtenidos con otros métodos validados;
- las comparaciones interlaboratorio;

La evaluación de la incertidumbre de medición de los resultados basada en la comprensión de los principios teóricos de los métodos y en la experiencia práctica del desempeño del método de muestreo o ensayo.

El apartado 7.2.2.2 menciona que cuando se hacen cambios a un método validado, se debe determinar la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que éstos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método.

El apartado 7.2.2.3 menciona que las características de desempeño de los métodos validados tal como fueron evaluadas para su uso previsto, deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y deben ser coherentes con los requisitos especificados.

NOTA Las características de desempeño pueden incluir, pero no se limitan, el rango de medición, la exactitud, la incertidumbre de medición de los resultados, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad del método, la linealidad, la repetibilidad o reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo y el sesgo.

En el apartado 7.2.2.4 El laboratorio debe conservar los siguientes registros de validación:

- a) el procedimiento de validación utilizado;
- b) la especificación de los requisitos;
- c) la determinación de las características de desempeño del método;
- d) los resultados obtenidos;
- e) una declaración de la validez del método, detallando su aptitud para el uso previsto.

A continuación se presentan cuatro razones por lo que es necesaria la validación (2010):

- ✓ Cumplir la normativa NTC/ISO/IEC 17025:2017

- ✓ Optimizar los procesos.
- ✓ Asegurar la calidad/mejorar la productividad.
- ✓ Reducir costos.

Cuando se procede con el plan de Validación, se requiere actuar mediante procedimientos correctos entre los que se incluyen; una buena organización; conocimiento del método; instalaciones adecuadas y suficientes; equipos, reactivos y material de laboratorio apropiado y en perfectas condiciones para su uso; métodos escritos, actualizados y aprobados. De esta forma se puede garantizar la calidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

En general, existen 3 tipos de validación:

- ✓ Validación Prospectiva: es aquella validación realizada a nuevos métodos analíticos.
- ✓ Validación Retrospectiva: Para antiguos métodos analíticos, pero que se emplean en forma rutinaria y que no han sido validados.
- ✓ Revalidación: repetición parcial o total de una validación debido a cambios efectuados, que puedan afectar a la capacidad del método validado. De la misma forma el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas de las observaciones hechas mientras se realiza la revalidación. (Guerrero H, DTA, 2007)

2.6.2. Importancia de Validar un Método

Es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación, se debe validar métodos no normalizados que corresponden a métodos nuevos o desarrollados en laboratorio, o métodos tradicionales que no estén normalizados. También puede ser un método normalizado con una modificación significativa.

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar; así como también

demostrar que las modificaciones que puedan haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados

2.7. DESARROLLO DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

- plan de validación
- determinación de los parámetros característicos, todos los seleccionados y pertinentes al método
- evaluación y procesamiento de datos
- informe final de Validación
- Protocolo del método

2.7.1. Plan de Validación

Cuando se procede con el plan de Validación, se requiere actuar mediante procedimientos correctos entre los que se incluyen; una buena organización; conocimiento del método; instalaciones adecuadas y suficientes; equipos, reactivos y material de laboratorio apropiado y en perfectas condiciones para su uso; métodos escritos, actualizados y aprobados. De esta forma se puede garantizar la calidad de los resultados obtenidos en laboratorio.

Para el desarrollo de las pruebas de validación, los analistas deberán conocer el procedimiento del método de ensayo y el número de ensayos o mediciones a realizar de acuerdo a lo establecido en el plan de validación. Es importante que el personal responsable de realizar los análisis se encuentre calificado y los equipos asociados al método deben encontrarse calibrados y controlados antes de su uso. Los resultados obtenidos en cada prueba deben ser debidamente registrados y almacenados. Los ensayos o mediciones realizadas tienen la finalidad de poder realizar las siguientes pruebas de parámetros de validación:

2.7.2. Selectividad

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés. (Guía EURACHEM, 2005)

2.7.3. Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultado instrumental que sea proporcional a la cantidad de analito que se determine en la muestra de laboratorio. Puede realizarse mediante un gráfico de concentración versus respuesta, llamado también curva de calibración como se puede observar en la **Figura 2**. Se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de valores teóricos conocidos; en este sentido, se recomienda partir de valores de cero o cercanos a cero y valores superiores.

Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la Curva de trabajo o curva de calibración. (Guía Técnica de Validación, 2010)

Evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente (m), el punto de corte (intercepto) con el eje de las Y (L_0), así como el coeficiente de correlación (r).

$$Y = X * m + L_0 \quad \text{Ec. 1}$$

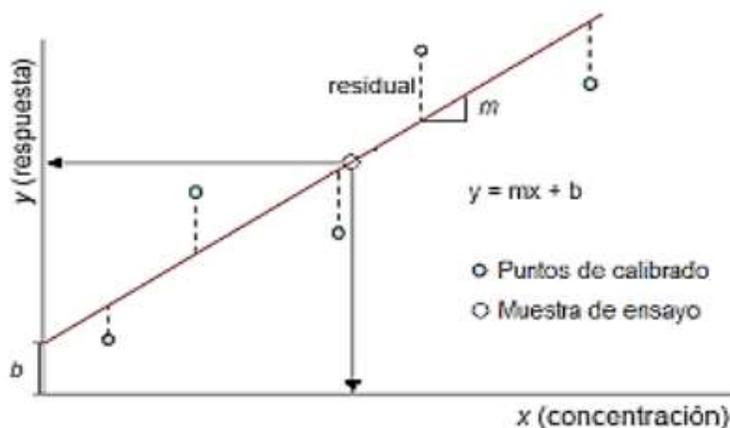


Figura 2 Curva de calibración, Concentración vs Respuesta
Fuente: Universidad Autónoma de México (UNAM)

$$Y = ax + b \quad \text{Ec. 2}$$

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (x) y la variable respuesta (y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar se encuentran en el intervalo de -1 y 1, el valor máximo de 1 indica una correlación positiva

perfecta (entre x e y). En la práctica si r tiene un valor cercano a 1 esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0,999 aunque para trazas se acepta un valor mayor o igual a 0,99. En el presente trabajo se determinó tomar el valor de 0,999.

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x * S_y} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde: $S_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i * Y_i}{n} - (x * y)$

Para:

$S_x * S_y$ es:

$$S_x = \sqrt{\left(\frac{\sum x_i}{n}\right)^2 - x^2}$$

$$S_y = \sqrt{\left(\frac{\sum y_i}{n}\right)^2 - y^2} \quad \text{Ec. 4}$$

La sensibilidad S, es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (b) de la recta de calibración y se calcula empleando la Ecuación 5:

$$b = \frac{\sum (x_i - x)(y_i - y)}{\sum (x_i - x)^2} \quad \text{Ec. 5}$$

Evaluación de la linealidad se realiza con la prueba de t-Student:

$$t_r = \frac{[r]\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ec. 6}$$

La correlación lineal se determina para evaluar la linealidad del método de estudio. Para comprobar el t_r con el valor tabulado t_{tab} con un grado de significancia del 95 % y $(n-2)$ grados de libertad.

Evaluación de resultados y eliminación de resultados anómalos

A los resultados obtenidos de las mediciones se les realiza una evaluación empleando la prueba de Grubbs. En una base de datos es probable que se encuentren resultados inconsistentes comparados con el resto de resultados, a veces se pueden identificar graficando los datos, aunque es conveniente obtener ensayos estadísticos que permitan evaluar si realmente son resultados inconsistentes. Es importante la identificación de estos datos anómalos ya que alteran la estimación de la media y la desviación estándar. Una prueba robusta que compara valores extremos con el valor medio y no con sus valores vecinos es la prueba de Grubbs que utiliza la desviación estándar, la cual es una medida de variabilidad más eficiente que el rango.

$$G_{1,n} = \frac{x_n - \bar{x}}{s} \quad \text{Ec. 7}$$

Se calcula un valor G_1 para el valor más bajo X_1 o más alto de la serie X_n .

- Si $G_{1cal} > G_{1crit}$ el resultado de la prueba es significativo y el dato evaluado es inconsistente.
- Si $G_{1cal} < G_{1crit}$ se aceptan los datos.

2.7.4. Límite de detección (LOD)

La Guía EURACHEM (2005), bajo la AOAC, define el límite de detección como: El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable. O bien el menor contenido de analito, si está presente, que será detectado y que puede ser identificado. De acuerdo a la Guía EURACHEM (2005). El límite de detección no tiene un criterio de aceptación, ya que depende del propósito de la metodología empleada, pero se puede determinar con la muestra en concentración cercana al blanco Se determina a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta S_a . (NB 5725-2, 2024-03-06)

$$LOD = t * \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n_y} + \frac{\bar{\mu}^2}{S_{XX}}} \quad \text{Ec. 8}$$

2.7.5. Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación se define como la cantidad más pequeña de un analito que se cuantifica confiablemente por el instrumento. Generalmente se define la cuantificación como la señal para una concentración igual a 10 veces la desviación estándar del blanco. (Guía EURACHEM, 2005).

Se determina a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a).

$$LOQ = 2 * t * \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n_y} + \frac{\bar{\mu}^2}{S_{XX}}} \quad \text{Ec. 9}$$

2.7.6. Sensibilidad Analítica

Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, concentración de un analito), es decir, el gradiente de la curva de respuesta. Según las diferentes guías de validación, la sensibilidad está dada por la pendiente de la curva de calibración y representa la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la concentración de analito.

$$Y = a + bC \quad \text{Ec. 10}$$

$$b = \frac{dy}{dC} \quad b = \frac{\Delta y}{\Delta C} \quad \text{Ec. 11}$$

Se puede mencionar que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, visualiza cómo se comporta el instrumento.

2.7.7. Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo es el método que proporciona con una incertidumbre aceptable, de acuerdo con los propósitos de aplicación del método.

Es el intervalo entre el nivel de concentración más bajo y más alto que ha sido demostrado y puede ser determinado con la precisión y exactitud requeridas para una determinada matriz. (Guia Tecnica de Validacion , 2010). En la **Figura 3** se presenta un ejemplo A) Ejemplo típico de una curva de respuesta obtenida con un método instrumental. Se identifican las características de desempeño ‘intervalo de trabajo’, ‘intervalo lineal’, ‘sensibilidad VM 2016 el que se representa la concentración medida en función de la concentración de la muestra de ensayo

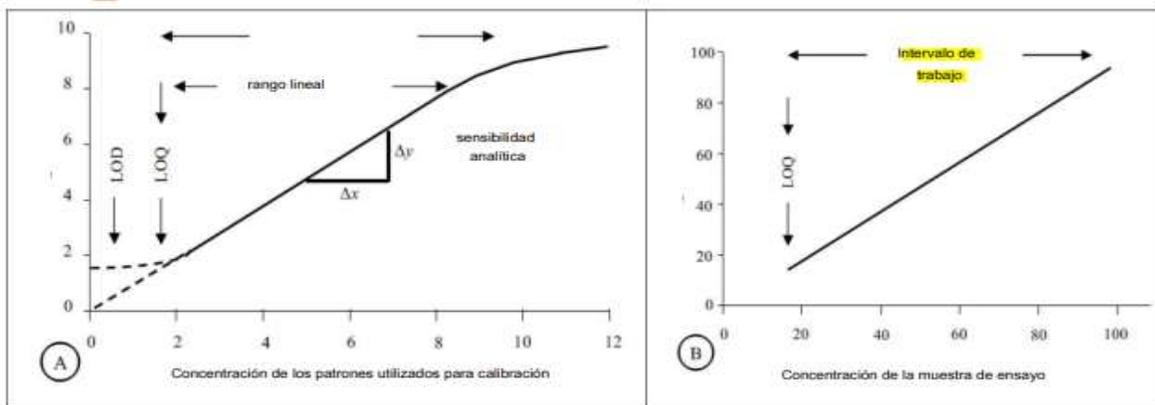


Figura 3. – ‘Intervalo de trabajo’, ‘Intervalo lineal’, ‘
Fuente: (Guía EURACHEM, 2005).

2.7.8. Selectividad

La Selectividad es la capacidad de un método para cuantificar exactamente un analito en presencia de interferencias. La selectividad es validada por la comparación de las inclinaciones de las curvas de adición de patrón. Se dice que un método es selectivo cuando es sensible a varios componentes. (Guia Tecnica de Validacion , 2010)

En la Selectividad se puede evaluar o minimizar el efecto del interferente. Es necesario distinguir entre el analito e interferente, como ser:

- Enmascaramiento; procedimiento mediante el cual una o varias de las partes de un ensayo no saben a qué grupo de tratamiento se encuentra asignado.
- Condiciones; condiciones ambientales, dentro de laboratorio, material adecuado, disposición de espacio, materiales y equipos.

- Separación: procedimiento en el cual la muestra se somete a dividir sus sustancias y mantener o no su identidad natural.
- Evaluar el efecto de matriz (efecto de recuperación); donde se observa que los componentes de la matriz interactúan con el analito e interfieren en su detección.
- Análisis de Blanco; un blanco en el análisis es una muestra que no contiene el analito de interés.
- Examinar los efectos de supresión o integración de Interferentes.

2.7.9. Precisión

Se define como precisión al grado de concordancia entre resultados que son obtenidos en mediciones repetidas bajo condiciones especificadas. La precisión de un método puede establecerse a partir de la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados.:

Con base en las definiciones se puede observar que entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, es más exacto, En la **Figura 4** se observa una representación de “Tiro al Blanco”, ampliamente utilizado para ejemplificar esto, los puntos u orificios equivaldrían a los resultados analíticos y el círculo rojo, al centro, el rango en el cual se espera este el valor de referencia (o verdadero). (Guia Tecnica de Validacion , 2010)

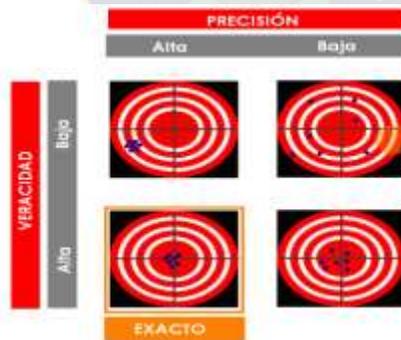


Figura 4. Precisión y Veracidad

Fuente: Aspectos Generales sobre Validación de Métodos.

2.7.10. Precisión Intermedia

La precisión intermedia es una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que

las condiciones de repetibilidad, entre las condiciones de variación intermedia, se debe mencionar equipos, analista o tiempo (distintos días y condiciones ambientales), manteniendo constantes el trabajo en un mismo laboratorio, el mismo método y las mismas muestras.

2.7.11. Repetibilidad

La repetibilidad de un método es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando realizadas bajo las mismas condiciones de medición. (Guía Técnica de Validación, 2010)

La repetibilidad se determina empleando la Ecuación 12

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2} \quad \text{Ec. 12}$$

Dónde:

S_r = desviación estándar de la repetibilidad;

\bar{x} = Promedio de lecturas realizadas;

n = número de lecturas realizadas;

x = muestra.

Para comparar la dispersión (variación) del conjunto de datos medidos, se utiliza el coeficiente de variación, mediante la ecuación 13

$$\%CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} * 100\% \quad \text{Ec. 13}$$

Dónde:

$\%CV_r$ = coeficiente de variación; S_r = desviación estándar de la repetibilidad; \bar{x} = promedio

2.7.12. Reproducibilidad

Se realiza para una misma muestra y un mismo método, con equipos y reactivos diferentes, en diferentes laboratorios, por tanto diferentes condiciones ambientales con personal diferente y también a distintos tiempos. (Guía EURACHEM, 2005)

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_k - x_i)^2} \quad \text{Ec. 14}$$

Dónde: S_r = desviación estándar de la repetibilidad; S_r^2 = Reproducibilidad.

Para comparar la dispersión (variación) de los conjuntos de datos medidos, se utiliza la ecuación 15:

$$\%CV_r = \frac{S_r}{x} * 100\% \quad \text{Ec. 15}$$

Dónde: $\%CV_r$ = coeficiente de variación; S_r = desviación estándar de la repetibilidad;

x = promedio

El porcentaje de la relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad es determinado empleando la ecuación 16:

$$r\&R = \sqrt{\%CV_r^2 + \%CV_r^2} \quad \text{Ec. 16}$$

Dónde: $r\&R$ = Porcentaje de relación entre la reproducibilidad y repetibilidad; $\%CV_r$ = coeficiente de variación de la repetibilidad; $\%CV_r$ = coeficiente de variación de la reproducibilidad.

Los resultados obtenidos se interpretan empleando los siguientes criterios.

- Si $\%r\&R < 10\%$ el sistema de medición es aceptable
- Si $10\% \leq \%r\&R < 30\%$ el sistema de medición puede ser aceptable según su uso, aplicación, costo, costo del instrumento de medición y costo de reparación.
- Si $\%r\&R > 30\%$ el sistema de medición es considerado como no aceptable y requiere de mejoras en cuanto al operador, equipo, método, condiciones y otros.

2.7.13. Exactitud

La norma ISO 5725 define Exactitud como el concepto de incertidumbre suponen que las mediciones se realizan de acuerdo al procedimiento documentado y que no se incluyen los efectos de los 'errores groseros' (equivocaciones). (Guía EURACHEM, 2005)

2.7.14. Veracidad

Veracidad' de medición es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, se puede realizar una evaluación práctica de la veracidad. (Guía EURACHEM, 2005)

- **Sesgo (s):** Es la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio. Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material de control, material de ensayos de aptitud: Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$s = x - x_a \quad \text{Ec. 17}$$

Dónde: s= sesgo, x = lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas. Xa = valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

- **Recuperación (R):** Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra. Se puede determinar empleando la ecuación 19

$$R = \left(\frac{C_e - C_0}{C_a} \right) \quad \text{Ec. 18}$$

Siendo: R= Recuperación. C_e = concentración de analito de la muestra enriquecida. C_0 = es la concentración de analito medida en la muestra sin adicionar. C_a = es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (%R): se calcula empleando la ecuación 20.

$$\%R = [R] * 100\% \quad \text{Ec. 19}$$

En caso de evaluar la recuperación, se deberá realizar prueba t , donde el $t_{cal} < t_{tab}$

$$t_{cal} = \frac{100-\%R}{s*\sqrt{n}} \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde: t_{cal} = Valor calculado; R = recuperación; s = Desviación estándar; n = Número de lecturas realizadas.

El Criterio de aceptación en base al valor obtenido para el porcentaje de recuperación puede emplearse los criterios de AOAC que recomienda, de acuerdo a la concentración esperada del analito y si él % R obtenido de la experiencia analítica se encuentra dentro del rango de %R teóricos esperados.

2.7.15. Robustez

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido, el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de este resultado confiable. Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas.

Entre las condiciones analíticas que podrían afectar a un método se encuentran:

- Analistas
- Equipos
- Reactivos
- pH
- Otros.
- Temperatura.
- Tiempo de reacción.
- Estabilidad de la muestra.

Para esta determinación se aplica el **Test de Youden y Steiner** para la evaluación de la robustez de un método químico analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra.

Para proceder a realizar el estudio de robustez se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales obtenidos a través del mismo. Estos factores están presentes habitualmente en el método (ejemplo: temperatura, composición de fase móvil o soluciones reactivas, pH de solución, tamaño de celda espectrofotométrica, flujo gas carrier, split, entre otros.).

Para ensayar la robustez se procede a un estudio de variable a cada factor, es decir se expone a una variación respecto de la establecida en el método, donde cada variable se estudia mediante un valor alto (A, B,...,G) y otro bajo (a,b,...,g). Una vez establecidos estos valores se diseñan ocho pruebas de ensayo como muestra la Tabla 5. Los factores a estudiar no deben ser necesariamente siete. Esto no afectará el balance del diseño del experimento, pero es importante considerar que siempre se deben llevar a cabo las ocho pruebas de ensayo indicado. Los resultados de la experiencia analítica obtenidos con las variaciones realizadas en estas 8 pruebas se representan con las letras s hasta la z.

A partir de los resultados obtenidos puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúscula) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúscula). Así, para evaluar el efecto de la primera variable se deben considerar las siguientes relaciones:

$$\frac{s+t+u+v}{4} = \frac{4A}{4} = A \quad \text{Ec. 21}$$

$$\frac{w+x+y+z}{4} = \frac{4a}{4} = a \quad \text{Ec. 22}$$

Es decir, la medida de los resultados (s+t+u+v) equivalen a “A” porque los seis restantes variables consideradas en estos cuatro resultados se anulan entre sí; por tanto, existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas de cada variable. Análogamente la media de los resultados (w+x+y+z) equivalen a “a”. Para cualquier otra variable se puede proceder de manera similar, tal como se muestra en la Tabla 8:

TABLA 8. Prueba de robustez de Youden y Steiner

Condición de la variable	Análisis Experimental							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	A	A	A	A	A	A	A	a
2	B	B	B	b	B	B	B	b
3	C	C	C	c	C	C	C	C
4	D	D	D	d	D	D	D	D
5	E	E	E	e	E	E	E	E
6	F	F	F	F	F	F	F	F
7	G	G	G	G	G	G	G	g
Resultado	S	T	U	v	W	X	Y	z

Fuente: Guía de Validación de Métodos Analíticos

Se deben establecer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor:

$$(A - a), (B - b), (C - c), (D - d), (E - e), (F - f) \text{ y } (G - g)$$

De este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ($\Delta = X - x$), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

Como criterio de aceptación para la robustez del método se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea superior a $\sqrt{2}$ de la desviación estándar de la precisión del método (S), es decir:

$$X - x < \sqrt{2}S \quad \text{Ec. 23}$$

2.7.16. Incertidumbre

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mensurado. En este sentido, es importante que, para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- Muestreo
- Efectos de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento y otros.
- Sesgos Instrumentales: debido a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: Temperatura, Pureza de Reactivos, Materiales de Referencia, Preparación de Estándares.
- Analista: debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralelaje
- Condiciones de medición: debidas al certificado de calibración: en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de k determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico y otros.
- Condiciones de medición: temperatura, humedad y otros.
- Otras: Método (por ejemplo, al interpolar en una recta), las constantes, pesada, alícuota, efectos computacionales y otros.

2.7.16.1. Incertidumbre Tipo A

Es la “evaluación de la incertidumbre de una medición mediante un análisis estadístico de los valores de las cantidades medidas obtenidas en condiciones definidas”, no se conoce el valor verdadero o de referencia del mensurado, éste se determina con la media de la serie de medidas y la incertidumbre está sobre la base de la desviación estándar.

2.7.16.2. Incertidumbre Tipo B:

No se obtiene por mediciones repetidas, este tipo de incertidumbre se basa en información externa (manuales, certificados y otros.) u obtenida por experiencias tales como:

- Resultados de mediciones anteriores.
- Experiencia o conocimientos generales sobre el comportamiento y las propiedades de los materiales e instrumentos utilizados.
- Especificaciones del fabricante.
- Datos suministrados por certificados de calibración u otro tipo de certificados.
- Incertidumbres asignadas a valores de referencias procedentes de libros y manuales.

2.7.16.3. Incertidumbre combinada

Es una estimación de la desviación estándar total, y es igual a la raíz de la varianza total obtenida por combinación de todos los componentes de la incertidumbre, se obtiene por reglas de propagación de errores.

2.7.16.4. Incertidumbre expandida:

Proporciona el intervalo en el cual el valor de la medida (valor verdadero) se encontrará con un alto nivel de confianza. aplicando el factor de cobertura adecuado. Por ejemplo, un factor de 2 para un intervalo con un nivel de confianza del, aproximadamente, 95 %. Para mayor información sobre cómo informar de la incertidumbre, se puede consultar la Sección 9 de la Guía Eurachem/CITAC (Guía EURACHEM, 2005)

$$w_{Fe} = [w_0 - w_{Bco}] * \frac{1}{f_r} * \frac{m_{af}}{m_{alic}} * \frac{m_{digestado}}{m_{harina}} * \beta_{met} \quad \text{Ec. 24}$$

Donde: w_{Fe} concentración de Fe, w_0 concentración inicial, w_{Bco} concentración del blanco, m_{af} masa del aforo, f_r factor de recuperación, m_{alic} masa de la alícuota, β_{met} reproducibilidad de la medición de Fe.

Método de Kratgen

2.8. METODO ESPECTROFOTOMETRICO

Los métodos espectrofotométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en la espectroscopia atómica y molecular. La Espectroscopia es un término general para la ciencia que trata de las distintas interacciones de la radiación con la materia. Históricamente las interacciones de interés se producían entre la radiación electromagnética y la materia; sin embargo, ahora el termino espectroscopia se ha ampliado para incluir las interacciones entre la materia y otras formas de energía.

La Espectrometría y los métodos Espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico.

Los métodos Espectrométricos más ampliamente utilizados son la radiación electromagnética, que es un tipo de energía que toma varias formas, de las cuales la más fácilmente reconocidas son la luz y el calor radiante. (Fundamentos de la Química Analítica , 9no edicion)

2.9. FUNDAMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE ABSORCIÓN ATOMICA

La aplicación analítica de la absorción atómica, tiene su fundamento en la fuerte absorción que presentan algunos átomos a longitudes de ondas características, que coinciden 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. 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, está dada por la ley de Beer. Esta ley es de fundamental importancia cuando se considera aspectos cuantitativos en los procesos de absorción atómica. (Y. A. CARDENAS GONZALES., 2005)

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. (Y. A. CARDENAS GONZALES., 2005)

2.9.1. Espectros de emisión atómica

A temperatura ambiente, todos los átomos de una muestra se encuentran en el estado fundamental. Por ejemplo, el único electrón externo del sodio metálico ocupa el orbital 3s. La excitación de este electrón a orbitales más altos se puede conseguir por el calor de una llama o un chispa o arco eléctrico. El tiempo de vida de un átomo excitado es breve, y su vuelta al estado fundamental va acompañada de la emisión de un fotón de radiación. (Association of Official Analytical Chemists , 1990)

2.9.2. Espectros de absorción atómica

En medio gaseoso a elevada temperatura, los átomos de sodio son capaces de absorber radiación de las longitudes de onda características de las transiciones electrónicas del estado 3s a estados excitados más elevados. De este modo, un espectro de absorción atómica característico consta predominantemente de línea de resonancia, que son el resultado de transiciones del estado fundamental a niveles superiores. (Espectrometría de emisión y absorción atómica, 2001)

2.10. Técnicas analíticas de espectroscopia de absorción atómica.

2.10.1. Interferencias

Se llaman interferencias a la influencia que ejerce uno o más elementos presentes en la muestra sobre el elemento que se pretende analizar. La clasificación de los distintos tipos de interferencias se presenta a continuación:

- Interferencias físicas: Efectos causados por las propiedades físicas de la muestra en disolución.
- Interferencias espectrales: Producida por radiaciones que alcanzan al detector a una longitud de onda muy próxima del elemento que se investiga.
- Interferencias químicas: Influencia que ejercen unos elementos sobre otros por formar, entre ambos, compuestos estables.
- Interferencia por efecto de matriz: Debidas a la influencia que tiene el entorno que rodea a los átomos en estado fundamental que se pretende analizar.

- Interferencias por absorción inespecíficas: Se presenta un aumento de la señal originado por la dispersión de las radiaciones de la lámpara.
- Interferencias por ionización: Debida a que parte de los átomos pasan al estado excitado. Para evitar al máximo estas interferencias habrá que optimizar el equipo eligiendo las condiciones más adecuadas para cada elemento. (Espectrometría de emisión y absorción atómica, 2001)

2.10.2. Métodos

Para el análisis de una muestra, lo primero que se debe hacer será poner las condiciones específicas del elemento a analizar. Estas condiciones vienen especificadas por el fabricante. Una vez elegidas las condiciones de trabajo para el elemento en cuestión habrá que calibrar el aparato. Para ello se pueden seguir dos procedimientos, la realización de una curva de calibrado o bien el método de adición. (Espectrometría de emisión y absorción atómica, 2001)

- **Curva de calibrado.** Se utilizan soluciones patrón, que contiene el elemento a determinar de concentración conocida. Se representan la absorbancia de cada solución patrón frente a la concentración. Se procura trabajar en el intervalo lineal de la curva. Una vez obtenida la curva patrón, se atomiza la muestra problema y se mide la absorción de la misma.
- **Método de adición.** Este método se emplea cuando existen interferencias. El método consiste en añadir un volumen conocido de la muestra problema. Al primer matraz no se le añade nada. Al segundo se le añade por ejemplo 1ppm. de forma que contenga una concentración añadida.

CAPITULO III

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El procedimiento de investigación definido para el presente trabajo, es de tipo experimental cuantitativo y estadístico. Previo a realizar el procedimiento, se recopila información teórica en temas de validación y procedimiento metodológico correspondientes a:

- Norma Boliviana NB 329031. Determinación de elementos traza-Pb, Cd, Zn, Cu, Fe y Cr mediante EAA,
- Norma Boliviana NB 39017 Determinación de Fe en Harina de Trigo - Método Instrumental,
- AOAC 985.35; Determinación Espectrofotométrica para matrices orgánicas.

Así mismo se consideran los requisitos de:

- Norma Boliviana NB 680 Harina y Derivados-Harina de Trigo-Requisitos.
- Normas Boliviana NB ISO/IEC 17025:2018, (Norma ISO 17025)
- Norma Española UN-EN-ISO/IEC ISO 17043:2023. Evaluación de la Conformidad Requisitos generales para los ensayos de aptitud. (ISO/IEC 17043, 24 junio del 2024)
- Norma Boliviana NB/ISO 17034:2016. Requisitos Generales para la competencia de los productores de materiales de referencia (ISO 17034, 02 abril del 2024)

3.1. INSTRUMENTOS Y SISTEMAS DE MEDICIÓN, EQUIPOS AUXILIARES

Para el trabajo de validación a ser desarrollado, se disponen de los siguientes materiales, equipos y reactivos ubicados en el IBMETRO Av. Camacho N^o. 1488-Edificio Anexo, que se presentan en las **Tablas 9, 10 y 11.**

TABLA 9. Materiales utilizados

MATERIAL	CARACTERISTICA
Micropipeta de 5000 µL	EPPENDORF-Alemania, Clase A, C.I. IBM-QMC-161
Micropipeta de 100 µL	BRAND-Alemania, Clase A, C.I. IBM-QMC-162
Tubos Teflón para Digestión por Microondas	PTFE capacidad 50 MI
Vasos de Precipitado	BOECO-Alemania, Boro 3.3
Frascos PEAD	No Aplica
Matraz Aforado de 1000 mL	ISOLAB-Alemania, Clase A, C.I.
Purificador de Agua	ELGA LabWater MICXXXXM1 C.I. Q-EA-09

Fuente. Elaboración Propia

TABLA 10. Equipos utilizados

EQUIPO	CARACTERISTICA
Balanza Analítica	Meter Toledo XS 204 alcance máximo 220 g C.I. Q-EM-01
Espectrómetro de Absorción Atómica / Q-PT-01	PerkinElmer Atomic Absorption Spectrometer PinAAcle 900T
Termohigrobarómetro	EXTECH INSTRUMENTS SD700 C.I. Q-EA-12
Set de pesas	HAFNER EA Alcance 50g/100g C.I. Q-PR-01
Refrigerador	GENERAL ELECTRIC GTE17HBWMRWW C.I. Q-EA-10
Horno de digestión por microondas	Anton Para Microwave Reaction System- Multiwave PRO
Campana extractora de gases	ESCO FRONTIER Laboratory Fume Hood
Calentador Agitador magnético.	No Aplica

TABLA 11. Reactivos utilizados

REACTIVO	CARACTERISTICA
Ácido nítrico (HNO₃) concentrado.	EMSURE, pureza al 65%p.a.
Peróxido de hidrogeno (H₂O₂)	EMSURE, pureza al 30% p.a.
Material de Referencia Certificado de Fe	NIST SRM 3126 ^a
Agua destilada	Sistema de purificación de H ₂ O
Agua tipo 1	Sistema de purificación de H ₂ O

Fuente. Elaboración Propia

3.2. LIMPIEZA

• Lavado de recipientes PEAD de laboratorio

Para el procedimiento Analítico, todos los materiales utilizados en el laboratorio pasaron por el siguiente procedimiento de lavado:

- i. Enjuagar los recipientes PEAD con agua desionizada mínimo tres veces
- ii. Preparar una solución de HNO₃ al 10%, y se llenan los recipientes con esta solución.
- iii. Dejar en reposo durante 2 días.
- iv. Proceder a vaciar la solución de los recipientes a un envase (solo de uso exclusivo)
- v. Enjuagar los recipientes con agua desionizada 3 veces
- vi. Llenar los recipientes con agua desionizada, y dejar reposar durante 1 día
- vii. Vaciar los recipientes y secarlos en la estufa a una temperatura de 65 °C.

3.3. MUESTRA

Las muestras a ser estudiadas son tres: dos como MRC del IBMETRO, y uno del NIST. Todos materiales de referencia con sus niveles designados:

3.3.1. Descripción de la harina de trigo:

Este Material de Referencia Certificado es producido a partir de la harina de trigo, disponible en una presentación de 70 g aprox. En frasco de vidrio ámbar tipo 3, de concentración en Fe (46.13±2.07) mg/kg Fe, MRC 125

• Almacenamiento y Uso

El Material de Referencia Certificado debe ser almacenado en oscuridad y refrigeración entre 2 °C y 8 °C hasta su uso; una vez abierto el MRC debe conservarse en su botella original y mantenerlo sellado, preferentemente mantenerlo dentro de un recipiente de mayor volumen, a la temperatura de almacenaje; de esta manera se garantiza su estabilidad. La botella debe mezclarse completamente dentro de su envase, luego dejar que el material se asiente por un minuto, con el fin de minimizar la pérdida de partículas finas; tomar la precaución de cerrar el envase entre las distintas pesadas. La cantidad mínima recomendada para el análisis es de 0.5 g. los valores son reportados en base seca.

- **Incertidumbre**

La incertidumbre declarada fue estimada como $U=k*uc$ donde U es la incertidumbre expandida, k el factor de cobertura igual a 2, con un nivel de confianza aproximado del 95% y uc es la incertidumbre estándar combinada de acuerdo a la “Guía para la expresión de la incertidumbre de medida” JCGM 100:2023; se consideran la U de caracterización, homogeneidad, estabilidad a corto plazo y largo plazo según la ISO 17034.

- **Valor Certificado**

TABLA 12. Valores de parámetros de harina de trigo MRC 125

Parámetros	Valores asignados	Incertidumbre U(k=2)	Unidades	Método Utilizado
Humedad	11,623	0,586	g/100 g	ISO 712:2009
Cenizas	0,726	0,038	g/100 g	ISO 2171:2007
Proteína	12,260	0,375	g/100 g	ISO 1871:2009
Grasa	1,215	0,097	g/100 g	NB 313019
Hierro	46,13	2,07	mg/ kg	EAA-Flama con adición estándar

Fuente IBMETRO

3.3.2. Descripción de la harina de Quinua:

Este Material de Referencia Certificado es producido a partir de la harina de quinua, disponible en una presentación de 70 g aprox. En frasco de vidrio ámbar tipo 3, de concentración en Fe (50.49 ± 2.27) mg/kg Fe, MRC 108.

- **Almacenamiento y Uso**

El Material de Referencia Certificado debe ser almacenado en oscuridad y refrigeración entre 2°C y 8°C hasta su uso; una vez abierto el MRC debe conservarse en su botella original y mantenerlo sellado, preferentemente mantenerlo dentro de un recipiente de mayor volumen, a la temperatura de almacenaje; de esta manera se garantiza su estabilidad. La botella debe mezclarse completamente dentro de su envase, luego dejar que el material se asiente por un minuto, con el fin de minimizar la pérdida de partículas finas; tomar la precaución de cerrar el

envase entre las distintas pesadas. La cantidad mínima recomendada para el análisis es de 0,5 g. los valores son reportados en base seca.

- **Incertidumbre**

La incertidumbre declarada fue estimada como $U=k*uc$ donde U es la incertidumbre expandida, k el factor de cobertura igual a 2, con un nivel de confianza aproximado del 95% y uc es la incertidumbre estándar combinada de acuerdo a la “Guía para la expresión de la incertidumbre de medida” JCGM 100:2023; se consideran la U de caracterización, homogeneidad, estabilidad a corto plazo y largo plazo según la ISO 17034.

- **Valor Certificado**

TABLA 13. Valor de parámetros de harina de Quinoa MRC 108

Parámetros	Valores asignados	Incertidumbre U(k=2)	Unidades	Método Utilizado
Cenizas	2,64	0,19	g/100 g	ISO 2171:2007
Proteínas	16,91	0,98	g/100 g	ISO 1871:2009
Grasas totales	7,38	1,74	g/100 g	NB 313019
Fibra cruda	2,98	0,54	g/100 g	NB 35004:2014
Hierro	50,49	2,27	mg/ kg	EAA-Flama con adición estándar

Fuente IBMETRO

3.3.3. Descripción de harina del NIST

Descripción

Una unidad de SRM 3234 consta de un frasco que contiene aproximadamente 50 g de harina de soja desgrasada preparada por un fabricante comercial. Cada botella esta sellada dentro de una bolsa aluminada. Para mayor información revisar página oficial del NIST como SRM 3234.

Valores certificados

Estos valores son trazables a la unidad de fracción de masa del Sistema Internacional de unidades (SI) expresada en mg/kg. Los valores se expresan en términos de masa seca

TABLA 14. Certificación de harina de soya NIST SRM 3234

Elemento	Fracción en masa (mg/ kg)
Calcio	3191±56
Cobre	15,34±0,26
Hierro	80,3±2,7
Magnesio	3487±60
Manganeso	36,78±0,88
Fosforo	8080±210
Potasio	25010±560
Zinc	48,9±1,1

Fuente. Standard Reference Material 3234 Soy Flour CERTIFICATE OF ANALYSIS

- Las muestras en las que se realizarán los análisis deben ser de un tamaño de partícula aproximadamente de 0,5 mm, por norma ASTM E-11/95, de diámetro 8'', N° 35. En cada frasco de MRC del IBMETRO.

3.3.4. Tratamiento previo

La muestra ha sido sometida a un tratamiento preliminar en relación masa/solvente; con respecto de: masa(harina) con los reactivos (HNO₃ al 65% pa, H₂O₂ 30%) como solventes de extracción.

Se optimiza la cantidad de masa/solvente, por el método de adición estándar, en grupos de ocho ensayos, obteniendo en cada ensayo, la evaluación del factor de recuperación por lo que se define las condiciones siguientes de la metodología.

3.4. DIGESTIÓN DE LA MUESTRA

Para la digestión de muestras de harina (matriz orgánica) se procede de la siguiente manera:

- Pesar 0,5 g de muestra de harina en tubos de teflón para digestión por microondas, con base al procedimiento de Medición de masa a través del pesado por diferencia¹. Anotar las masas medidas en la Bitácora de la Balanza.
- Añadir a la muestra 2 mL de HNO₃ concentrado y 1 mL de H₂O₂ al 30 %, empleando micropipetas adecuadas, realizar esta operación en la campana de extracción.

¹ El procedimiento para pesar se basa en la “Medición de masa a través del pesado por diferencia”, que significa que **a.** el peso del recipiente vacío, **b.** el peso del recipiente con la sustancia, y **c.** el peso de la sustancia que se obtiene por diferencia, restando al peso del recipiente con la sustancia, y el peso del recipiente vacío, el cual se opta por la mínima fuente error en la determinación de la incertidumbre.

- En lugar de optar por el procedimiento de calcinación de la muestra como indica la ISO/NB-39017, se opta por el método de digestión por microondas basado en la AOAC 985.35, este cambio tan importante se lo realiza por el tiempo de preparación de la muestra, el cual es un factor importante en el reporte de resultados. Siguiendo las indicaciones del uso del horno de digestión de microondas, se crea un método con la rampa que se presenta en la Figura 5:

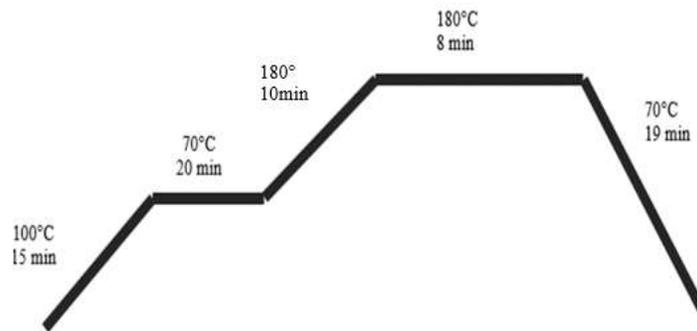


Figura 5. Rampa de Digestión por el método de microondas
Fuente. Elaboración propia

- Por instructivo de digestión de muestras orgánicas e inorgánicas mediante digestión por microondas respaldado por el IBMETRO, se debe trabajar con al menos 8 muestras de una misma muestra y su respectivo blanco, con total de 10 tubos de teflón.
- Enfriar las muestras, una vez concluido el programa de la digestión ácida por Microondas se recomienda dejar la muestra en reposo toda la noche para disminuir la presión de los gases generados dentro del tubo de digestión.
- Retirar la tapa que tiene el tubo una vez concluido el tiempo de enfriamiento; posteriormente se traslada a la sala de balanzas donde se transfiere la muestra cuantitativamente a frascos PEAD, previamente esterilizados con la finalidad de evitar toda forma de vida microbiana, tanto patógena como saprofita de objetos inanimados, rotular apropiadamente.
- Aforar gravimétricamente la muestra con una solución de HNO₃ al 2%.

3.5. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Las disoluciones patrón para Fe, se preparan a partir de un material de referencia certificado de Fe NIST SRM 3126, cuya concentración es de 10013 mg/kg.

- Preparar una solución de trabajo de 25 mg/kg a partir de la solución de Fe NIST SRM 3126.
- Preparar soluciones para la curva de calibración, para ello se realizan las diluciones a partir de la solución de trabajo, estas son presentadas en la Tabla 15

TABLA 15. Preparación de la curva de calibración

Rango mg/kg	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Masa solución de Fe a pesar para preparar 25 g de solución	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0

Fuente propia

- Las soluciones son aforadas con HNO₃ al 2% en concentración (v/v).
- Almacenar en un frasco de PEAD que debe tener rotulado el valor del estándar preparado, la fecha de preparación y fecha de validez.
- Agitar el frasco para homogeneizar, sellar con para film los frascos que contienen los estándares, introducirlo en bolsas de aluminio y almacenarlas bajo refrigeración.
- Las disoluciones madre, remanentes se pueden guardar en un envase plástico, cerrar, etiquetar y almacenar. Estas soluciones son estables en condiciones de anaquel aproximadamente 6 meses.
- Al realizar la lectura de las soluciones estándar para determinar la curva de calibración verificar el valor de R (coeficiente de correlación), que debe ser $\geq 0,995$.
- La curva de calibración se repite en cada determinación.

3.5.1. Determinación de la fracción en masa de Fe por Espectrometría de Absorción Atómica

- Condiciones de operación del equipo

TABLA 16. condiciones de la operación del Equipo EAA

Equipo de Espectroscopia de Absorción Atómica	Parámetros
Longitud de onda(λ)	248.33nm
Lámpara	Cátodo hueco de Cu y Fe
Oxidante- comburente	Aire/ Acetileno
Apertura	0.7mm
Eliminación de interferencias	KCl 0.2%
Sensibilidad	Estándar de Al 50mg/ L=0.22 absorbancia
Energía de la lámpara	60 Hz

Fuente. Elaboración propia

- Para el control interno del equipo, se realiza una calificación en cada análisis con una solución estándar de Cu de concentración de 4 mg/ kg.

Mediante la ecuación se determina la fracción de Fe en la muestra Digerida:

$$W_{Fe} = [w_0 - w_{Bco}] * \frac{1}{f_r} * \frac{m_{af}}{m_{smp}} * \beta_{met}$$

$$w_0 = \text{conc. inicial}; x = \frac{Y_0 - b}{m}; \frac{mg}{kg}$$

w_{Bco} = conc. del blanco

f_r = Factor de recobro; factor de recuperacion

- Cálculo y expresión de los resultados

El contenido de Fe presenta en la muestra de harina de trigo se expresa mediante la

siguiente fórmula:

Masa de Fe, mg/kg Frasco

$$\frac{mg}{kg} Fe = mg Fe \text{ medido} * \frac{m \text{ muestra digestada}}{m \text{ muestra}}$$

Fe en, mg/kg Frasco seco

$$\frac{mg}{kg} Fe = \frac{mg}{kg} Fe_{\text{frasco}} * \frac{m \text{ muestra seca}}{m \text{ muestra}}$$

3.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3.6.1. Procedimiento de Validación

El Procedimiento de Validación del presente trabajo pretende demostrar experimentalmente y en forma documentada que la metodología funciona para el fin propuesto.

3.6.1.1. Requisitos previos a tener en cuenta antes de la validación

- | | |
|--|--|
| ✓ Conocer el método a validar | ✓ Patrones de Referencia y Muestras de Ensayo. |
| ✓ Conocer el compuesto a analizar | ✓ Reactivos |
| ✓ Contar con Equipos Calificados y calibrados y certificados por el IBMETRO. | ✓ Envases y Materiales |
| | ✓ Tratamiento de la Muestra |

3.6.1.2. Desarrollo del plan de validación

- | | |
|---|---------------------------------|
| • Definiciones de características y Requisitos previos. | • Validación |
| • Optimización | • Documento final de Validación |
| | • Certificado de Validación. |

3.7. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

En la **Tabla 17.** se presentan los parámetros característicos de desempeño para validar el método de ensayo:

TABLA 17. Parámetros de validación

Nº	PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN
1	Linealidad	Se determina mediante la curva de calibración. Con criterio de aceptación $\geq 0,9995$
2	Límite de detección	Se determinará el límite de detección de la calibración externa del Espectrómetro de Absorción Atómica con los datos de la curva de calibración.
3	Límite de cuantificación	Se determinará el límite de cuantificación de la calibración externa del EAA con los datos de la curva de calibración. Método de cálculo mediante la ISO 11843
4	Repetibilidad	Se realizará con 1 analista en condiciones de repetibilidad. En laboratorio 10 réplicas por muestra el mismo día. NB/ISO 5725-3
5	Reproducibilidad interna	Se realizará con 1 analista en diferentes días. 8 determinaciones por muestra y dos blancos. NB/ISO 5725-5
6	Robustez	Se determinará la robustez del método mediante el modelo de Youden – Steiner estudiando 7 variables que podrían afectar la medición de Fe en harina. <ol style="list-style-type: none"> 1. Cantidad de muestra (g) 2. Cantidad de volumen del solvente HNO₃ (mL) 3. Cantidad de volumen de H₂O₂ (mL) 4. Digestión previa con HNO₃ 5. Tiempo de digestión (min) 6. Temperatura de digestión (°C) Factor de adición Interno Conc. Fe
7	Sesgo	Se determinará el sesgo del método comparando las concentraciones determinadas experimentalmente con las establecidas en los certificados de los MRC NIST harina de soya, en cada análisis .
8	Incertidumbre	Se determinará la incertidumbre del método considerando posibles fuentes de error.

Fuente. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos- Guía de Laboratorio para Validación de Métodos –GUIA EURACHEM –Norma la ISO 11843

3.7.1. Determinación de la Linealidad

Para determinar la linealidad del método se realiza el siguiente procedimiento:

- ✓ Se prepara una curva de calibración en un rango de concentración de Fe de 0,1 a 1,8 mg/kg, con el fin de obtener un coeficiente de correlación $\geq 0,999$.
- ✓ Se evalúan los datos identificando outliers mediante el Test de Grubbs.
- ✓ Se calcula el coeficiente de correlación, intercepto, pendiente y gráfica de residuos.
- ✓ Se utilizará el método de mínimos cuadrados, para calcular la recta de regresión lineal que minimiza los residuos, esto es, la diferencia entre los valores reales y los estimados por la recta. Se revisa su fundamento y la forma de calcular los coeficientes de regresión con este método.

3.7.2. Determinación de Sensibilidad Analítica

Para realizar la Determinación de la Sensibilidad Analítica en el método espectrométrico para el análisis de Fe, se empleó estadísticamente una regresión lineal y pendiente de la curva y con la cual se procede a realizar un estudio de sensibilidad, Se realizará una prueba mediante adición de estándar, donde el factor de recuperación debe cumplir el criterio del plan de validación. Rango de factor de recuperación de 0,85 a 1,15.

3.7.3. Determinación de límite de detección y cuantificación.

Para determinar el límite de detección y límite de cuantificación en el análisis de Fe, se emplea estadísticamente la regresión lineal y se calcula a partir de los datos de estudio de linealidad, Basado en la norma ISO 11843.

3.7.4. Determinación de selectividad

Se efectúa si es selectivo el método para la determinación de Fe, con base en la NB- 39017, y el método de análisis de la AOAC 985.35, en las muestras de harina de trigo y harina de quinua.

Se prepara 10 muestras de una Matriz de harina de Trigo, con concentración de Fe, disponibles en IBMETRO como Material de referencia con una concentración en fracción de masa de $(46,13 \pm 2,07)$ mg/kg Fe.

Se prepara 10 muestras de una Matriz de harina de Quinoa, con concentración de Fe, disponibles en IBMETRO como Material de referencia con una concentración en fracción de masa de $(50,49 \pm 2,27)$ mg/kg Fe.

Se realizó el procedimiento mediante el método de adición estándar por una curva de calibración, con una matriz de referencia con la adición de Fe y una muestra digerida.

Se realizaron 5 réplicas por nivel de concentración en cada grupo.

La selectividad se determina por comparación con respecto a la adición del analito y el factor de recuperación.

Para los cálculos se determinó la t-Student mediante el factor de recuperación, como criterio de aceptación.

3.7.5. Determinación de precisión

Para la precisión se realizó las siguientes determinaciones en función de la repetibilidad.

- ✓ Se determinó la concentración de la muestra realizando 10 réplicas en diferentes horas.
- ✓ Se consideró para la repetibilidad la misma muestra, el mismo laboratorio, el mismo material, los mismos reactivos, las mismas condiciones ambientales y el mismo analista.
- ✓ Los cálculos realizados fueron en general de los datos obtenidos y evaluación del comportamiento de los distintos modelos estadísticos.

- Modelo Constante (MC)
- Modelo Lineal (ML)
- Modelo Lineal con intersección en cero (Mlo)
- Modelo Potencial (MP)

3.7.6. Determinación de precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia del método de determinación de fracción en masa de Fe por Espectrofotometría de Absorción Atómica, se realizó mediciones en dos diferentes días, en un total de 16 Muestras, utilizando un cambio en el tiempo y las condiciones ambientales.

3.7.7. Determinación de reproducibilidad

Para determinar la Reproducibilidad en la metodología del análisis de Fe se realizó mediciones en diferentes días, un total de 4 días, con la misma matriz, en el mismo laboratorio, el mismo material, los mismos reactivos, diferente analista, diferentes condiciones ambientales.

- Para el criterio de aceptación se empleó la Norma Boliviana NB 329031, el valor reportado no será mayor al valor del límite de Reproducibilidad R en más de un 5 % de los casos.

3.7.8. Determinación de Sesgo y Exactitud

La determinación de la exactitud, se realizó en función del sesgo.

- ✓ Se prepara un conjunto de muestra de material de referencia certificado MRC, que contiene la matriz dentro de la curva de linealidad y se determina su concentración.
- ✓ Se prepara otro conjunto de muestras que contienen la matriz a una concentración conocida y se determina sus concentraciones.
- ✓ Se calcula el porcentaje de recuperación y recuperación aparente.

3.7.9. Determinación de Robustez

Para este parámetro se plantea un estudio de siete variables en el método analítico con ocho pruebas de ensayo para cada variable o valor de condición, para realizar este análisis se aplica el Test Youden Steiner y se determina si las diferencias empleadas tienen un efecto significativo.

Las variables seleccionadas para el estudio son:

- i. Cantidad de muestra (g) (0.5/1)
- ii. Cantidad de volumen del solvente HNO₃ (mL) (4/2)

- iii. Cantidad de volumen de H₂O₂ (mL) (2/1)
- iv. Digestión previa con HNO₃ (con/sin)
- v. Tiempo de digestión (min) (15/8)
- vi. Temperatura de digestión (°C) (180/160)
- vii. Factor de adición Interno Conc. Fe (3/2)

para conocer el efecto de cada variable: se calcula la media y desviación estándar s , de los 8 resultados y se multiplica $s \cdot \text{raíz } (2)$.

- Si el valor de $|A-a| \dots |D-d| > s \cdot \text{raíz } (2)$; existe diferencia significativa
- Si el valor de $|A-a| \dots |D-d| < s \cdot \text{raíz } (2)$; no existe diferencia significativa.

Cuanto mayor sea la diferencia mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

3.7.10. Determinación de Incertidumbre

Para determinar la incertidumbre de tipo A, se realizó a partir de cálculos obtenidos de las muestras del rango de trabajo mediante el intervalo de confianza con los resultados y mínimos obtenidos.

Para determinar la incertidumbre tipo B, se consideró toda variable en la metodología de análisis y determinar las variables que llegan a influir.

Finalmente se calcula la incertidumbre expandida de la concentración de Fe en las harinas.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el ANEXO 1 del presente trabajo, se referencia un instructivo propuesto de optimización del método en condiciones y especificaciones establecidas.

La validación del método analítico comprende la realización de varias pruebas con la matriz de Harina certificada Standard Reference Material 3234 Soy Flour. Para demostrar el alcance y las limitaciones del método analítico, se realizaron análisis estadísticos para determinar los parámetros de validación del método.

- Se trabaja con una solución patrón preparada de hierro de concentración inicial w_0 igual a 999.46 mg/kg Sol estándar de Fe NIST.
 - Preparación de solución de Fe de 25 mg/kg aprox.

Para la preparación inicial se considera las siguientes condiciones ambientales con las que se trabaja en laboratorio, considerando el respectivo certificado de calibración del Termohigrobarómetro en el ANEXO 2, ANEXO 3, y ANEXO 4

TABLA 18. Condiciones ambientales promedio del procedimiento.

Condición	Inicial	Inicial corr.	Final	Final corr.	Promedio	Densidad del aire, kg/m ³	Densidad masa patrón, kg/m ³
T °C	22,1	23,6	22,5	21,9	22,8	0,7766	8000
P (hPa)	669,9	663,5	667,0	666,7	665,1		
Hr(%)	43,5	47,6	53,8	59,2	53,4		

Fuente. Elaboración propia.

Se realiza la preparación de pesada por diferencia de la disolución de trabajo de Fe para cada análisis, siendo: m_{bv} masa del frasco vacío; m_{Fe} masa de Fe patrón; m_{b+Fe} masa del frasco + la masa de Fe; m_{HNO_3} masa de solución de HNO₃ al 2%; y m_t la masa total, obteniendo la siguiente tabla:

TABLA 19. Preparación de solución de trabajo de Fe

#	m ₁	m ₂	m ₃	Prom.	Masa corr.	mreal obt. por dif., g	Densidad, kg/m ³	mcorr. por emp. aire, g
mbv, g	19,52	19,52	19,52	19,52	19,52			
mFe, g	10,56	10,56	10,56	10,56	10,56	10,56		
mb+Fe, g	30,08	30,08	30,08	30,08	30,08		1006	10,57
mHNO₃, g	95,26	95,26	95,26	95,26	95,26	105,83		
mt, g	125,35	125,35	125,35	125,35	125,35		994	105,90

Fuente. Elaboración propia.

– **Preparación de las diluciones de Fe en mg/kg.**

A partir de la preparación de la solución de trabajo de Fe, se procede a preparar las diluciones de trabajo con las que se construirá una curva de calibración, considerando que $w_1 = \frac{w_2 * m_2}{m_1}$

donde: **w₁** es la concentración requerida, **m₂** es la masa de la solución de trabajo inicial; y **m₁** es la masa alícuota requerida; y realizando el mismo procedimiento de pesada por diferencia, se obtienen los siguientes resultados mostrados en la tabla 20.:

TABLA 20. Preparación de las diluciones de trabajo

Crequ.mg/kg	0,2	0,4	0,6	0,8	1,00	1,2	1,4	1,6	1,8	2,00	unidad
M₁ alic	0,24	0,45	0,61	0,83	1,01	1,23	1,43	1,60	1,81	2,08	g
M₂Aforo	25,07	25,07	25,05	25,06	25,06	25,07	25,05	25,05	25,04	25,13	g
w₂ MRC	25,72	25,72	25,72	25,72	25,72	25,72	25,72	25,72	25,72	25,72	mg/kg
w₁ final	0,24	0,46	0,63	0,85	1,04	1,26	1,47	1,64	1,86	2,13	mg/kg
Densidad HNO₃ 2%	994										kg/m ³

Fuente. Elaboración propia.

El procedimiento de preparación se repite para cada análisis de cuantificación, por lo que se miden n cantidad de veces, sin embargo y considerando que se debe trabajar en las mismas condiciones ambientales, aproximadamente misma cantidad de solución de trabajo para obtener datos reproducibles, se presentan 3 datos representativos para cada nivel de concentración, mostrados en la tabla 21 con su respectiva lectura de absorbancias medidas en el equipo.

TABLA 21. Datos experimentales de Absorbancia de Diluciones de Fe estándar NIST.

NOMBRE	NOMBRE	X		Y		Y
		w, mg/kg	promedio	Absorbancia	Absorbancia corr	Absorbancia promedio
MR1	1	0,241	0,231	0,011	0,011	0,011
		0,220		0,011	0,011	
		0,232		0,011	0,011	
MR1	2	0,462	0,460	0,021	0,021	0,021
		0,456		0,021	0,021	
		0,461		0,022	0,022	
MR1	3	0,631	0,629	0,029	0,029	0,029
		0,613		0,029	0,029	
		0,642		0,029	0,029	
MR1	4	0,851	0,848	0,038	0,038	0,039
		0,843		0,040	0,040	
		0,850		0,039	0,039	
MR1	5	1,035	1,025	0,047	0,047	0,047
		1,000		0,047	0,047	
		1,040		0,047	0,047	
MR1	6	1,265	1,254	0,057	0,057	0,057
		1,250		0,057	0,057	
		1,247		0,057	0,057	
MR1	7	1,466	1,459	0,067	0,067	0,067
		1,450		0,067	0,067	
		1,462		0,068	0,068	
MR1	8	1,645	1,635	0,074	0,074	0,074
		1,624		0,074	0,074	
		1,635		0,074	0,074	
MR1	9	1,861	1,855	0,084	0,084	0,084
		1,863		0,083	0,083	
		1,840		0,084	0,084	
MR1	10	2,126	2,109	0,088	0,088	0,087
		2,090		0,087	0,087	
		2,110		0,087	0,087	

Fuente. Elaboración propia.

Lo que se busca con los valores obtenidos es analizar que el sistema de medición tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia, denominándolo, así como nuestro rango de trabajo, por lo que puede mostrar la siguiente gráfica, donde se presenta el promedio de los datos obtenidos:



Figura 6. Curva de calibración de Fe respecto al rango de trabajo
Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en el gráfico de la figura 8, y realizando la evaluación estadística se muestra que el conjunto de los 10 niveles de concentración promedio proporcionan una recta de calibración, sin embargo, se detecta que el último valor se dispersa de la recta, afectando el coeficiente de correlación, por lo que se consideran 9 niveles de concentración que son aceptados por criterio de laboratorio y pertenecen al conjunto de la representación del rango lineal, teniendo así una nueva grafica representativa mostrada de la siguiente manera:

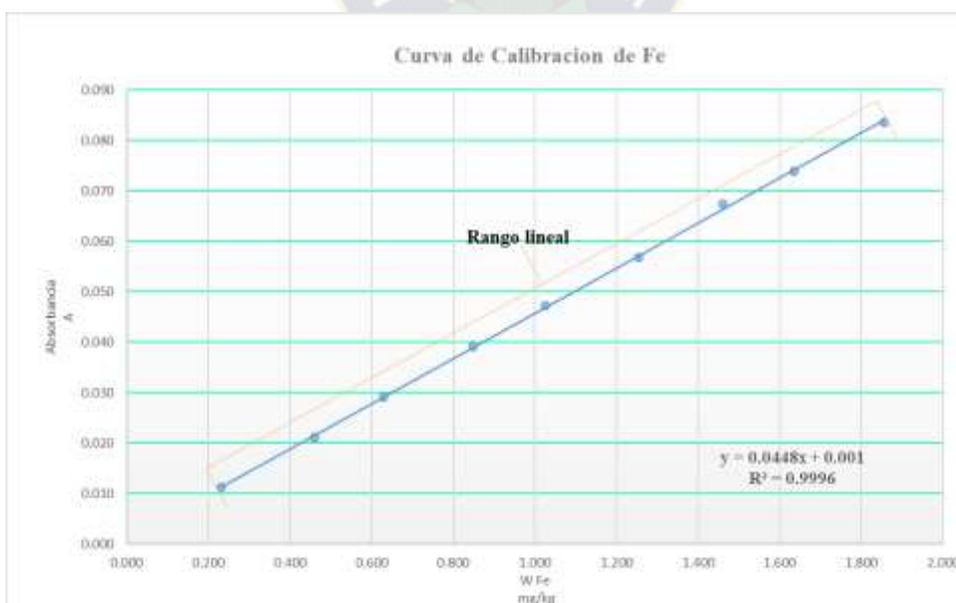


Figura 7. Curva de calibración de Fe respecto al rango lineal
Fuente: Elaboración propia

Por lo tanto, la ecuación de la curva de calibración se expresa de la siguiente manera:

$$\text{Abs} = 0.0448W_{\text{Fe}} + 0.001; \text{ con } R^2 = 0.9996$$

– **Preparación de la muestra de harina digerida y primer aforo de concentración 25 mg/kg**

Se realiza la preparación usando la técnica de pesada por diferencia para cada muestra de harina, los mismos que son registrados en la bitácora de laboratorio, considerando las condiciones ambientales de trabajo para cada muestra, se obtiene las siguientes tablas representativas:

TABLA 22. Condiciones ambientales de trabajo

Condición	Iniciales	Iniciales corregido	Finales	Finales corregido	Promedio	Densidad del aire, kg/m ³	Densidad masa patrón, kg/m ³
T °C	23,0	22,4	23,2	22,6	22,5		
P (hPa)	663,9	663,6	663,7	663,4	663,5	0,7757	8000
Hr(%)	46,5	51,9	46,0	51,4	51,7		

Fuente. Elaboración propia

TABLA 23. Representación de preparación de la muestra de harina de trigo

#	Pesada para digestión					Masa real obtenida por diferencia, g	Densidad (kg/L)	Masa corregida por empuje del aire, g
	m 1	m 2	m 3	Prom	Masa corregida por certificado, g			
m tubo, g	153,5	153,5	153,5	153,5	153,5			
m muestra, g	0,5011	0,5010	0,5009	0,5010	0,5010	0,5024	7877	0,5024
mtubo+ muestra, g	154,0	154,0	154,0	154,0	154,0			

Fuente. Elaboración propia

El procedimiento de preparación de la tabla 23, se repite para cada preparación de muestra, considerando mantener las mismas condiciones ambientales, aproximadamente misma cantidad de muestra por lo que, una vez realizado el proceso de digestión se prepare una solución madre de concentración 25mg/ de la muestra digerida, obtenida en la tabla

TABLA 24. preparación de la muestra digerida

Primer aforo de la muestra digerida								
	m1	m2	m 3	Promedio	Masa corregida por certificado, g	Masa real obtenida por diferencia, g	Densidad (kg/L)	Masa corregida por empuje del aire, g
m bv, g	14,96	14,96	14,97	14,96	14,96			
mM1+Aforo, g	25,03	25,03	25,03	25,03	25,03	25,04	1006,00	25,05
m total, g	40,00	40,00	40,03	40,00	40,00			

Fuente. Elaboración propia

En el **ANEXO 5** se presenta el certificado de calibración de la balanza utilizada con su respectiva incertidumbre combinada **u**, para los resultados de medición. Con la finalidad de obtener un resumen de los valores pesados para cada muestra:

TABLA 25. Resumen del procedimiento de digestión de muestras

RESUMEN				
Muestra	Masa muestra (g)	u muestra (g)	Aforo (g)	u aforo (g)
MA	0,502	0,0002	25,05	0,0001
MB	0,501	0,0001	25,04	0,0001
MC	0,504	0,0001	25,02	0,0001
MD	0,506	0,0002	25,06	0,0001

Fuente. Elaboración propia

– **Preparación de la muestra mediante el método de adición estándar**

Con una solución de Fe estándar, de concentración conocida, se procede a tomar alícuotas de la muestra digerida de 25mg/ kg y mediante el método de adición estándar se cuantificará la cantidad de Fe presente en la muestra original en mg/ kg.

En la siguiente tabla se muestra el procedimiento de preparación de la muestra *sin adición* siendo **m bv** masa del frasco vacío; **MD** masa de muestra Digerida a 25 mg/ kg; **m b+ MD** masa del frasco +masa de la muestra digerida; **m HNO₃** masa del HNO₃ y **m total** la masa total.

TABLA 26.preparación de la muestra sin adición

<i>Preparación de la muestra sin adición</i>								
#	m 1	m 2	m 3	Prom	Masa corregida	masa real obtenida por diferencia	Densidad (kg/L)	Masa de empuje del aire (g)
m bv, g	8,15	8,15	8,15	8,15	8,15			
m MD+mg/kg, g	7,51	7,51	7,51	7,51	7,51	7,51	994	7,51
m b+MD, g	15,66	15,66	15,66	15,66	15,66			
m HNO₃, g	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	15,01	994	15,02
m total, g	23,1	23,16	23,16	23,16	23,16			

Fuente. Elaboración propia

Por otro lado, en la tabla 27 se muestra el procedimiento de preparación de la muestra *con adición* y con siendo **m bv**; masa del frasco vacío; **MD**; masa de muestra Digerida a 25 mg/ kg; **m b+MD**; masa del frasco +masa de la muestra digerida; **m Fe**; masa de Fe de concentración 0,8 mg/ kg y **m total** la masa total.

TABLA 27.preparación de la muestra con adición

<i>Preparación de la muestra con adición</i>								
#	m1	m 2	m 3	Prom	Masa corr.	masa real obtenida por diferencia	Densidad (kg/L)	Masa de empuje del aire (g)
m bv, g	8,16	8,16	8,16	8,16	8,16			
m MD 25 mg/kg, g	7,51	7,51	7,51	7,51	7,51	7,51	994,00	7,52
m b+MD, g	15,67	15,67	15,67	15,67	15,67			
m Fe 0,8mg/kg, g	7,52	7,52	7,52	7,52	7,52	7,52	994,00	7,53
m total, g	23,19	23,19	23,19	23,19	23,19	15,03	994,00	15,05

Fuente. Elaboración propia

Este procedimiento se realiza durante todo el periodo de optimización del método y la validación, considerando que las condiciones de trabajo son aspectos importantes para el desarrollo.

Se debe tener en cuenta que durante el periodo de digestión de la matriz de harina se determina la humedad de las misma, con la finalidad de obtener resultados más precisos.

– **Determinación de Humedad de matriz de harina**

– **Muestra**

Pesar rápidamente; una cantidad de 5 g de la muestra en la caja Petri; registre la masa de la porción de prueba sin secar y la caja Petri vacía como m_0 . Previamente se seca y junto con su tapa se pesa, registrar la masa m_{cp} .

– **Secado**

Colocar la caja Petri abierta que contiene la porción de prueba junto con la tapa, en la estufa de secado. Deje durante $120 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ a $130 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$.

No abrir la puerta de la estufa durante el secado y no coloque productos húmedos en el horno antes de retirar las partes de prueba secas, ya que esto resultará en la rehidratación parcial de esta última.

Después del secado, retirar rápidamente la caja Petri de la estufa de secado, cubrirlo y colocarlo en el desecador.

Cuando se están realizando varias pruebas, nunca se debe colocar platos uno encima del otro en el desecador, sino que colóquelos uno al lado del otro.

Cuando la caja Petri se haya enfriado a temperatura ambiente (generalmente entre 30 minutos y 45 minutos después de haber sido colocado en el desecador), pesar y registrar la masa de la porción de prueba seca y la caja Petri como m_1 .

– **Expresión de los resultados**

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{m_1 - m_{cp}}{m_0 - m_{cp}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 25}$$

m_{cp} = masa en gramos de la caja Petri.

m_0 = masa en gramos de la porción de muestra sin secar en la caja Petri.

m_l = masa en gramos de la porción de muestra secada en la caja Petri.

En la tabla 28 se muestra la representación de determinación de humedad de los diferentes tipos de harina por lo que se consideran 3 datos representativos para la cuantificación

TABLA 28. Determinación de Humedad

	Matriz de harina					
	DATO 1		DATO 2		DATO 3	
	Humedad %	U	Humedad %	U	Humedad %	U
Harina de Trigo	10,520	±0,126	10,480	±0,117	9,696	±0,118
Harina de Quinoa	8,892	±0,890	8,532	±0,072	8,730	±0,872
Harina de soya	5,829	±0,19	5,384	±0,11	5,793	±0,292

Fuente. Elaboración propia

Por consiguiente, se procede a validar la metodología con el procedimiento establecido.

4.1. Linealidad

Se realiza una regresión y estimación de los coeficientes del polinomio de 1er orden, mostrando así una ecuación de tipo lineal.

Para trabajar la linealidad se realiza un estudio de regresión lineal, lo que se busca es analizar que el sistema de medición tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia en el rango estudiado.

– Análisis del cumplimiento del criterio de validación

El análisis de regresión fue realizado con MSC Excel versión 2016, tomando los valores de referencia y los promedios experimentales de cada nivel de concentración.

En la **Tabla 21** se presenta un resumen de los resultados medidos por el equipo de EAA que nos sirven para determinar la linealidad a través de la pendiente (**b**), intercepto (**a**), coeficiente de correlación r^2 , con un criterio de aceptabilidad, por lo que se realiza una evaluación de significancia mostrados en una curva de calibración **Figura 9**; donde se graficaron 9 niveles de

concentración; ahora bien, con los datos obtenidos se realizará un análisis de evaluación visual en la presencia de tendencias con el coeficiente de correlación por lo que se tiene:

Estadísticas de la regresión	
<i>Pendiente m</i>	0,0448
<i>Intercepto b</i>	0,0010
<i>Error típico</i>	3,19496E-05
<i>R²</i>	0,9996

De acuerdo a la norma ASTM D 1068 – 03 Métodos de ensayo estándar para determinación hierro en agua, se indica que un rango de trabajo de 0,1 mg/L a 5,0 mg/L por la técnica de AA es el adecuado, así mismo de acuerdo a la Norma Boliviana NB 680 en la que se establece la concentración mínima permitida de hierro en harinas fortificadas debe ser 30 mg/kg. Se considera que; la medición es de 0,2 a 1.8 mg/kg por lo que se presenta un criterio de aceptabilidad:

PLAN DEL PARAMETRO: Se preparará una curva de calibración de 9 niveles de Conc. y se realizará un análisis de residuales **ANEXO 7**, donde el coeficiente de correlación tiene que ser mayor a 0,995.

RESULTADO	
criterio planteado	$R^2 \geq 0,995$
criterio obtenido	0.9996

De acuerdo a los resultados de las mediciones obtenidos se cumple el criterio de aceptabilidad planteado.

4.2. Límite de detección, Cuantificación y Sensibilidad Analítica

– Límite de detección

El criterio según la ISO 13530; con respecto a la evaluación del límite de detección que a continuación se detalla; se basa en la determinación del modelo lineal **ANEXO 7**; siendo

$$LOD = t * \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n_y} + \frac{\bar{\mu}^2}{S_{XX}}} \quad \text{Ec. 26}$$

Donde: $S_{x/y}$ es la desviación estándar residual; b es la pendiente; t es el test estadístico a 95%, n_y es el número total de mediciones y m en el número de réplicas; mostrando el resumen de resultados obtenidos:

TABLA 29. Resumen de resultados

$n_y =$	27
$m(\text{replicas}) =$	3
$S_{y/x} =$	5,83E-04
$s_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$	33,84
$\bar{\mu} =$	1,054
$b =$	0,044848
$t(95\%) =$	2,059538553

Fuente. Elaboración propia

Por lo que el límite de detección es el siguiente: LOD: **0,09**

Lo que indica que la concentración mínima detectable es de 0,09 mg Fe/kg.

– **Límite de cuantificación**

Para determinar el límite de cuantificación se usa los datos del modelo lineal; siendo:

$$LOQ = 2 * t * \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n_y} + \frac{\bar{\mu}^2}{S_{XX}}} \quad \text{Ec. 27}$$

Donde: $S_{x/y}$ es la desviación estándar residual; b es la pendiente; t es el test estadístico a 95%, n_y número total de mediciones y m en el número de réplicas que también se presentan en la tabla 33; dando con resultado: LOQ: **0,16**

Lo que indica es que la concentración más baja del analito que puede ser determinada a un nivel aceptable de precisión y repetibilidad es 0,16 mg Fe/kg.

– **Sensibilidad analítica**

Si bien la sensibilidad analítica es una característica de desempeño no muy importante; en sistemas de medición espectrofotométrica, se puede predecir la absorbancia a partir de la ley de

Beer-Lambert; esto puede utilizarse como una verificación del desempeño del instrumento de la siguiente manera:

$$S_{C_0} = \frac{S_{xy}}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} * \frac{(Ab_0 - Ab)^2}{b^2 * \sum_1^n (C_i - C)^2}} \quad \text{Ec. 28}$$

Donde: S_{C_0} es desviación estándar de las respuestas; S_{xy} es la desviación estándar residual; m en el número de réplicas; n número total de mediciones; b es la pendiente; $(Ab_0 - Ab)^2$ diferencia de absorbancia con respecto al blanco; $C_i - C$ diferencia de concentración con respecto al blanco

Obteniendo un valor de $S_{C_0} = 0,007841$

- El resultado con respecto a la sensibilidad analítica γ es el siguiente:

$$\gamma = t * \frac{b}{S_{C_0}} = 1,8595 * \frac{0,0004505}{0,007841}$$

$$\gamma = 0,106836 \text{ mg/ kg}$$

4.3. Selectividad

La selectividad se evalúa por comparación de las inclinaciones de las curvas de adición patrón. Considerando la siguiente ecuación:

$$f_r = \left(\frac{m_{m+AE} - m_m}{m_{AE}} \right) \quad \text{Ec. 29}$$

Donde: m_{m+AE} es masa del aforo preparado + adición estándar de Fe; m_m es masa del aforo de la muestra digerida; m_{AE} es la diferencia del factor de adición estándar de Fe menos el aforo de la muestra digerida con adición estándar. Datos obtenidos en la **tabla 26 y 27**

Por lo cual la recuperación intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra, debe cumplir el siguiente criterio de aceptación con experiencia en laboratorio debe estar entre el Rango de factor de recuperación de **0,85 a 1,15**. Que en términos de % es del 85% al 115%

Considerando la matriz analizada con y sin adición estándar se tiene la siguiente tabla:

TABLA 30. Resultados del factor de recuperación en la muestra digerida

Harina de trigo			Harina de quinua			Harina de soya		
secuencia	Abs. Prom	Factor de recuperación	secuencia	Abs. Prom	Factor de recuperación	secuencia	Abs. Prom	Factor de recuperación
T1	0,022	0,821	Q1	0,022	0,861	N1	0,399	0,923
T2	0,022	0,814	Q2	0,022	0,847	N2	0,402	0,928
T3	0,022	0,959	Q3	0,022	0,871	N3	0,409	0,841
T4	0,023	0,916	Q4	0,022	0,874	N4	0,422	0,848
T5	0,023	0,936	Q5	0,022	0,834	N5	0,365	0,891
T6	0,023	0,941	Q6	0,022	0,834	N6	0,372	0,871
T7	0,022	0,912	Q7	0,021	0,894	N7	0,376	0,880
T8	0,022	0,902	Q8	0,021	0,906	N8	0,370	0,889
T9	0,021	0,957	Q9	0,021	0,923	N9	0,410	0,885
T10	0,021	0,950	Q10	0,021	0,942	N10	0,409	0,884
promedio	0,022	0,910	promedio	0,022	0,876	promedio	0,393	0,884

Fuente. Elaboración propia

El ANEXO 8 muestra el comportamiento de las diferentes muestras con adición estándar y sin adición estándar, considerando la cantidad de la muestra madre utilizada, realizando el Test de Grubbs.

De esta manera se comprueba que el factor de recuperación es un dato aceptado, y que no hay efecto de matriz significativo, por lo tanto, el método es selectivo.

4.4. Precisión

4.4.1. Repetibilidad

Considerando las condiciones de precisión en el estudio de repetibilidad, y mediante la norma ISO 5725 -2, se consideran las siguientes variables:

- Mismo método
- Mismo patrón
- Mismos equipos
- Mismos reactivos
- Mismas instalaciones
- Mismas condiciones ambientales

Considerando estas variables se realiza un análisis de datos para determinar la desviación estándar de repetibilidad del método optimizado; considerando los siguientes pasos:

– Calcular el promedio de las mediciones $\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$ **Ec. 30**

– Calcular la desviación estándar de las mediciones individuales $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$ **Ec. 31**

– Determinar los grados de libertad $U=n-1$; y realizar la siguiente multiplicación $(U=n-1)s^2$; y se determina el promedio de los promedios $\bar{\bar{X}}$ y realizar un análisis de consistencia intra-ensayos basado en la norma ISO 16269.

$$k = \frac{s \cdot \sqrt{N}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N S_i^2}}$$

– Estimar el K de mandel

Donde **K**-Mandel evalúa la consistencia de la variación de las mediciones individuales

Si: $k \leq k_{crit}$; el dato S_i es consistente y se acepta

Si: $k \geq k_{crit}$ el dato S_i es no es consistente y debe rechazarse

– Estimar el C de Cochán's

Para luego realizar un análisis de valores atípicos, donde se estima **C** de Cochán 's; que nos sirven para evaluar los valores atípicos en términos de varianza; luego se tiene:

Si: $C \leq C_{crit}$; el dato S_i es consistente y se acepta

Si: $C \geq C_{crit}$ el dato S_i es no es consistente y debe rechazarse

Por lo que finalmente se determina la desviación estándar de repetibilidad S_r

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (n-1) \cdot S_i^2}{\sum_{i=1}^N (n-1)}} \text{ Ec. 32}$$

Para luego calcular el coeficiente de variación $CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} 100$

– El mismo procedimiento se realiza para cada muestra de matriz; mostrado en las siguientes tablas:

TABLA 31. Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad de Fe (mg/kg)

MUESTRA	MEDICIONES		$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$ $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$		Consistencia intra ensayos	Valores atípicos de dispersión		
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg				
	x ₁	x ₂			$k = \frac{S \cdot \sqrt{N}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N S_i^2}}$ $k < k_{critico}$	$C = \frac{S_i^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}$ $C < C_{critico}$		
Harina de Trigo	52,52	52,85	52,68	0,2365	0,43	Dato Consistente	0,047	Dato aceptado
Harina de Trigo	47,60	47,78	47,69	0,1275	0,23	Dato Consistente	0,014	Dato aceptado
Harina de Trigo	45,50	46,83	46,17	0,9391	1,72	Dato Consistente	0,746	Dato aceptado
Harina de Trigo	42,60	43,28	42,94	0,4781	0,87	Dato Consistente	0,193	Dato aceptado

Fuente: Elaboración Propia

TABLA 32. Determinación de la desviación estándar y coeficiente de varianza

Muestra	$\sum_{i=1}^N S_i^2$	$\sum_{i=1}^N (n-1)$	k _{critico} (95%)	C _{critico} (95%)	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$	$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (n-1) \cdot S_i^2}{\sum_{i=1}^N (n-1)}}$	$CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} 100$
Harina de Trigo	1,18	4	1,76	0,906	45,37	0,5307	1,12

Fuente: Elaboración Propia.

TABLA 33. Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad de Fe (mg/kg)

MUESTRA	MEDICIONES		$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$ $S = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{X})^2}{n-1}}$		Consistencia intra ensayos	Valores atípicos de dispersión		
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg				
	X ₁	X ₂			$k = \frac{S \cdot \sqrt{N}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N S_i^2}}$ $k < k_{critico}$	$C = \frac{S_i^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}$ $C < C_{critico}$		
Harina de Quinoa	51,97	52,08	52,02	0,079	1,10	Dato consistente	0,204	Dato aceptado
Harina de Quinoa	50,12	49,96	50,042	0,107	1,48	Dato consistente	0,368	Dato aceptado
Harina de Quinoa	52,16	52,11	52,14	0,037	0,52	Dato consistente	0,045	Dato aceptado
Harina de Quinoa	49,65	49,50	49,58	0,109	1,51	Dato consistente	0,383	Dato aceptado

Fuente: Elaboración Propia.

TABLA 34. Determinación de la desviación estándar y el coeficiente de varianza

MUESTRA	$\sum_{i=1}^N S_i^2$	$\sum_{i=1}^N (n-1)$	k_{crítico} (95%)	C_{crítico} (95%)	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$	$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (n-1) \cdot S_i^2}{\sum_{i=1}^N (n-1)}}$	$CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} 100$
Harina de Quinua	0,031	4	1,76	0,906	50,949	0,088	0,17

Fuente: Elaboración Propia.

TABLA 35.. Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad de Fe (mg/kg)

MUESTRA	$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$ $S = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{X})^2}{n-1}}$				Consistencia intra ensayos		Valores atípicos de dispersión	
	mg/kg		mg/kg		$k = \frac{S \cdot \sqrt{N}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N S_i^2}}$ k < k_{crítico}	$C = \frac{S_i^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}$ C < C_{crítico}	C	C < C _{crítico}
	X ₁	X ₂	mg/kg	mg/kg				
Harina de NIST	80,84	80,98	80,91	0,09	0,16	Dato consistente	0,005	Dato aceptado
Harina de NIST	77,61	79,06	78,34	1,03	1,73	Dato consistente	0,503	Dato aceptado
Harina de NIST	79,25	78,27	78,76	0,69	1,16	Dato consistente	0,228	Dato aceptado
Harina de NIST	78,78	79,84	79,31	0,74	1,26	Dato consistente	0,265	Dato aceptado

Fuente: Elaboración Propia.

TABLA 36. Determinación de la desviación estándar y el coeficiente de varianza

MUESTRA	$\sum_{i=1}^N S_i^2$	$\sum_{i=1}^N (n-1)$	k_{crítico} (95%)	C_{crítico} (95%)	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$	$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (n-1) \cdot S_i^2}{\sum_{i=1}^N (n-1)}}$	$CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} 100$
Harina de NIST	2,11	4	1,76	0,906	79,33	0,727	0,92

Fuente: Elaboración Propia.

Con los datos de Sr se procede a calcular el límite de repetibilidad

N	S _r	CV _r	RC_r=f(n)S_r (en función de S_r)	RC_r=f(n)S_{CV} (en función de S_{CV})	f(n) (Según ISO 5725-6)
	mg/kg	%	mg/kg	%	
3.0	0.4487	0.737	1.481	2.431	3.3

Por iteración se define el comportamiento del modelo de combinación de contribuciones constantes y relativas a una desviación estándar combinada. **ANEXO 9**

Por lo que finalmente de los cálculos realizados se puede observar una desviación estándar de repetibilidad que tiene tendencia razonable según el modelo constante MC; por lo tanto, una buena estimación de repetibilidad de este modelo representa el siguiente criterio de validación:

Si ($Sr \leq$ "Criterio de validación") la evaluación se cumple en todos los niveles de concentración estudiados, se cumple el criterio.

Si ($Sr \geq$ "Criterio de validación") la evaluación no se cumple, por lo que los datos deben ser rechazados

TABLA 37. Desarrollo del criterio de validación

MUESTRA	X	v	$\alpha = 0,05$	Sr=5%	Sr=0,449	Criterio de validación	evaluación $Sr \leq$ "Criterio de validación"
	mg/kg			mg/kg	mg/kg		
Harina de Trigo	47.37	4	12	2.3686	0.449	4.119	Criterio de validación cumplido
Harina de Quinoa	50.95	4	12	2.5475	1.864	4.430	Criterio de validación cumplido
Harina de Soya (NIST)	79.33	4	12	3.9667	0.007	6.897	Criterio de validación cumplido

Fuente. Elaboración propia

En la siguiente tabla se detalla la conclusión de la condición de la repetibilidad:

El estudio tiene como conclusión que el laboratorio reúne todas las condiciones apropiadas para el uso previsto del método validado en condiciones de repetibilidad. Siendo la desviación estándar en condiciones de repetibilidad: 0,449 mg/ kg.

4.4.2. Reproducibilidad

Considerando las condiciones de precisión en el estudio de repetibilidad, y mediante la norma ISO 5725 -3, se consideran lo siguiente:

- Primeramente, se determina la repetibilidad S_r ; para determinar el coeficiente de variación de repetibilidad que se realizó en el apartado 4.4.1.
- Se determina la variación entre los grupos como S_d ; para determinar el coeficiente de variación entre los grupos como C_{vd}
- Finalmente se determina la reproducibilidad interna como S_L y determinar el coeficiente de reproducibilidad interna CV_L

Se repite el procedimiento para cada nivel de concentración, también se realiza un análisis de valores atípicos intra-ensayos bajo la norma ISO 16269-4

- Estimar G de Grubbs

Donde **G**-de Grubbs evalúa valores atípicos en los promedios

Si: $G \leq G_{crit}$; el dato X_i promedio se acepta

Si: $G > G_{crit}$ el dato X_i promedio es un valor no consistente y debe rechazarse

- Estimar el h- Mandel

Para luego realizar un análisis de valores atípicos, donde se evalúa la consistencia de la variación de las mediciones individuales

Si: $h \leq h_{crit}$; el dato X_i es consistente y se acepta

Si: $h > h_{crit}$ el dato X_i es un valor atípico y debe rechazarse

- El procedimiento se repite para cada muestra de matriz; mostrado en las siguientes tablas:

TABLA 38. Determinación de la reproducibilidad interna harina de trigo

FECHA	MUESTRA	MEDICIONES				$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$ $S = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{X})^2}{n-1}}$	Valores atípicos de centralidad	
		mg/kg		mg/kg			$G = \frac{\bar{X}_i - \bar{X}}{S_x}$	$G < G_{critico}$
		x ₁	x ₂	mg/kg	mg/kg			
23/02/2024	Harina de Trigo	52,52	52,85	52,68	0,2365	0,43	Dato aceptado	
23/02/2024	Harina de Trigo	47,60	47,78	47,69	0,1275	0,23	Dato aceptado	
23/02/2024	Harina de Trigo	45,50	46,83	46,17	0,9391	1,72	Dato aceptado	
23/02/2024	Harina de Trigo	42,60	43,28	42,94	0,4781	0,87	Dato aceptado	
26/02/2024	Harina de Trigo	46,83	47,87	47,35	0,7307	0,78	Dato aceptado	
26/02/2024	Harina de Trigo	48,48	46,94	47,71	1,0895	0,96	Dato aceptado	
26/02/2024	Harina de Trigo	44,70	41,29	42,99	2,4138	0,34	Dato aceptado	
26/02/2024	Harina de Trigo	44,01	44,34	44,17	0,2382	0,76	Dato aceptado	

Fuente: Elaboración propia

TABLA 39. Determinación del coeficiente de reproducibilidad interna

N	Muestra	h _{critico} (95%)	G _{critico} (95%)	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$		S _r	$CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} 100$	$CV_d = \frac{S_d}{\bar{X}} 100$	S _L	$CV_L = \frac{S_L}{\bar{X}} 100$
				mg/kg	mg/kg					
8	Harina de Trigo	1,75	2,13	45,74	2,05	1,06	2,32	5,17	1,83	4,01

Fuente: Elaboración Propia.

TABLA 40. Determinación de la reproducibilidad interna harina de quinua

FECHA	MUESTRA	MEDICIONES				Valores atípicos de centralidad	
		mg/kg	mg/kg			$G = \frac{\bar{X}_i - \bar{X}}{S_{\bar{X}}}$	$G < G_{critico}$
		X ₁	X ₂	mg/kg	mg/kg		
23/02/2024	Harina de Quinua	51,97	52,08	52,02	0,079	0,77	Dato aceptado
23/02/2024	Harina de Quinua	50,12	49,96	50,042	0,107	0,43	Dato aceptado
23/02/2024	Harina de Quinua	52,16	52,11	52,14	0,037	0,65	Dato aceptado
23/02/2024	Harina de Quinua	49,65	49,50	49,58	0,109	0,87	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Quinua	50,90	50,34	50,62	0,3999	0,63	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Quinua	50,54	51,76	51,15	0,8613	0,16	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Quinua	54,14	53,16	53,65	0,6938	0,40	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Quinua	50,05	49,25109	49,65	0,5706	0,58	Dato aceptado

Fuente. Elaboración propia

TABLA 41. Determinación del coeficiente der reproducibilidad interna

N	Muestra	h _{critico} (95%)	G _{critico} (95%)	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$	$S_{\bar{X}}$	S_r	$CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} 100$	S_d	$CV_d = \frac{S_d}{\bar{X}} 100$	S_L	$CV_L = \frac{S_L}{\bar{X}} 100$
				mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
8	Harina de Quinua	1,75	2,13	50,82	2,03	0,60	1,18	2,87	5,64	2,07	4,08

Fuente. Elaboración propia

TABLA 42. Determinación de la desviación estándar de reproducibilidad interna para el nivel de concentración de harina Certificada NIST

FECHA	MUESTRA	MEDICIONES				VALORES ATÍPICOS DE CENTRALIDAD	
		mg/kg	mg/kg	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$ $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$		G	G < G _{critico}
		X ₁	X ₂	mg/kg	mg/kg		
23/02/2024	Harina de Soya (NIST)	80,84	80,98	80,91	0,09	0,16	Dato aceptado
23/02/2024	Harina de Soya (NIST)	77,61	79,06	78,34	1,03	1,73	Dato aceptado
23/02/2024	Harina de Soya (NIST)	79,25	78,27	78,76	0,69	1,16	Dato aceptado
23/02/2024	Harina de Soya (NIST)	78,78	79,84	79,31	0,74	1,26	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Soya (NIST)	79,30	80,64	79,97	0,94	0,11	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Soya (NIST)	79,70	80,67	80,18	0,6833	0,32	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Soya (NIST)	81,56	81,26	81,42	0,21	1,52	Dato aceptado
26/02/2024	Harina de Soya (NIST)	80,02	79,80	79,91	0,15	0,06	Dato aceptado

Fuente. Elaboración propia

TABLA 43. Determinación del coeficiente de reproducibilidad interna

Muestra	h _{critico} (95%)	G _{critico} (95%)	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$	S _{\bar{x}}	s _r	CV _r = $\frac{s_r}{\bar{X}} \cdot 100$	S _d	CV _d = $\frac{S_d}{\bar{X}} \cdot 10$	S _L	CV _r = $\frac{S_L}{\bar{X}} \cdot 100$
			mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
Harina de Soya (NIST)	1,75	2,13	79,8542	1,033	0,66589	0,834	1,4607	1,829	1,135152	1,422

Fuente. Elaboración propia

TABLA 44. Determinación de la desviación estándar de reproducibilidad interna

Muestra	N	N	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$	S_L	CV_L	S_r	S_d
			mg/kg	mg/kg	%	mg/kg	%
Harina de Trigo	8	2,0	45,7460	1,836	4,014	1,065	2,368
Harina de Quinoa	8	2,0	50,8233	2,074	4,081	0,601	2,871
Harina de Soya (NIST)	8	2,0	79,8542	1,135	1,422	0,666	1,461

Por iteración se define el comportamiento del modelo de combinación de contribuciones constantes y relativas a una desviación estándar combinada. **ANEXO 9**

Por lo que finalmente de los cálculos realizados se puede observar una desviación estándar de repetibilidad que tiene tendencia razonable según el modelo constante MC; por lo tanto, una buena estimación de repetibilidad de este modelo representa el siguiente criterio de validación:

Si ($S_r < \text{"Criterio de validación"}$) el estudio tiene como conclusión que el laboratorio reúne todas las condiciones apropiadas para el uso previsto del método validado en condiciones de reproducibilidad interna

Si ($S_r > \text{"Criterio de validación"}$) el estudio tiene como conclusión que el laboratorio no tiene las condiciones apropiadas para el uso previsto del método validado en condiciones de reproducibilidad interna .

Por lo que en la siguiente tabla se detalla la conclusión de la condición de la Reproducibilidad

TABLA 45. criterio de validación

N° MUESTRA		$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{X}_i}{N}$	$r = \frac{((n-1) \cdot S^2 + (n \cdot S_0^2))^2}{\left(\frac{n-1}{\theta}\right) S^2 + \left(\frac{n^2 \cdot (S_0^2)^2}{\theta-1}\right)}$	$\chi^2_{\left(\left(1-\frac{\alpha}{2}\right); v\right)}$	$S_L = 3.186 \pm 0.026X$	Criterio de validación	Evaluación $S_L \leq \text{Criterio}_V$	
		mg/kg		$\alpha = 0,05$				mg/kg
1	Harina de Trigo	45,75	8	19	2,2873	2,967	3,409	Criterio de validación cumplido
2	Harina de Quinoa	50,82	7	17	2,5412	2,996	3,889	Criterio de validación cumplido
3	Harina de Soya (NIST)	79,85	8	19	3,9927	2,966	5,936	Criterio de validación cumplido

Como; $S_L <$ Valor del criterio de validación: en todos los niveles de concentración estudiados, se tiene como conclusión que el laboratorio reúne todas las condiciones apropiadas para el uso previsto del método validado en condiciones de reproducibilidad interna. Siendo la desviación estándar en condiciones de reproducibilidad: $S_L = 2,967 \frac{mg}{kg}$

4.5. Robustez

En la determinación primeramente se define los niveles de estudio o también llamados condición de las variables; por lo que se realiza las mediciones bajo las condiciones del arreglo experimental por replicado y en condiciones de repetibilidad, se trabajara bajo el diseño experimental Youden Steiner, mostrado en la tabla 44.

TABLA 46. Diseño experimental de Youden Steiner

Valor de la condición de la variable	ANALISIS EXPERIMENTAL								diseño experimental
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A, a	A	A	A	A	A	A	a	A	
B, b	B	B	B	B	B	B	b	B	
C, c	C	C	C	C	C	C	C	C	
D, d	D	D	D	D	D	D	D	D	
E, e	E	E	E	E	E	E	e	E	
F, f	F	F	F	F	F	F	f	F	
G, g	G	G	G	G	G	G	G	G	
Resultado	S	T	U	V	W	X	y	Z	

Fuente. Guía de Validación de Métodos Analíticos

Bajo las condiciones del diseño experimental se tienen las siguientes variables definidas; que pueden o no ser influyentes en el análisis; por lo que se tiene la siguiente tabla:

TABLA 47. Variables en el análisis de Fe en la harina

Nro de variable	Tipo	Clave	valor ALTO	valor BAJO
1	Cantidad de muestra (g)	A, a	1	0,5
2	Cantidad de HNO ₃ (mL)	B, b	4	2
3	Cantidad de H ₂ O ₂ (mL)	C, c	2	1
4	Digestión previa con HNO ₃ (con/sin)	D, d	Con	Sin
5	Tiempo de digestión (min)	E, e	15	8
6	Temperatura de digestión (°C)	F, f	180	160
7	Factor de adición Interno Conc. Fe	G, g	3	2

RESULTADO mg/Kg Fe

La medida de los resultados (s + t + u + v) equivale a "A" y la media de los resultados (w + x + y + z) equivale a "a". Al comparar estos dos valores medios de "A" y "a", se conoce la influencia de la variable en estudio.

TABLA 48. Resultados obtenidos del estudio de Robustez

Clave	Variable ALTO	Variable BAJO	Concentración (mg/kg)
A, a	46,48	46,84	46,658
B,b	46,26	47,06	46,66
C, c	45,75	47,57	46,66
D, d	46,06	47,26	46,66
E, e	48,17	45,15	46,66
F, f	46,47	46,84	46,66
G, g	46,78	46,53	46,66
	N		14
	Promedio		46.66
	desviación estándar		0,75630321
	s*raíz(2)		1,069574257

CRITERIO DE ACEPTACION

Si el valor de $|A-a| \dots |D-d| > s \cdot \text{raíz}^2$; **existe diferencia significativa**

si el valor de $|A-a| \dots |D-d| < s \cdot \text{raíz}^2$; **no existe diferencia significativa.**

Por cuanto mayor sea la diferencia mayor será la influencia que tendrá dicha variable en el método analítico.

Por lo que en la siguiente tabla se presenta el análisis para cada variable, considerando la ASTM E 1169, se tiene:

TABLA 49. Criterio de aceptación para el estudio de Robustez

Variable	Concentración (mg/Kg)	$s \cdot \text{raíz}^2$	$ A-a \dots D-d > s \cdot \text{raíz} (2)$ $ A-a \dots D-d < s \cdot \text{raíz} (2)$
A-a	-0,37	1,06957	no existe diferencia significativa
B-b	-0,80	1,06957	no existe diferencia significativa
C-c	-1,82	1,06957	no existe diferencia significativa
D-d	-1,20	1,06957	no existe diferencia significativa
E-e	3,02	1,06957	existe diferencia significativa
F-f	-0,37	1,06957	no existe diferencia significativa
G-g	0,25	1,06957	no existe diferencia significativa

Fuente. Elaboración Propia

Es así que existe diferencia en una variable en el periodo del *tiempo de digestión*, por lo que debe considerarse que el proceso metodológico debe ser controlado porque de no ser así la digestión no se completa por lo que contribuye a la precisión del método, afectando el factor de recuperación, y como tal la cantidad de Fe presente en la muestra. Por otro lado, no existe diferencia significativa en los restantes parámetros evaluados, tales como: la cantidad de la muestra, cantidad de reactivos (HNO_3 ©, H_2O_2 30%), Digestión previa, temperatura de digestión, y el factor de adición estándar, por lo que se considera que el laboratorio cuenta con las condiciones del diseño experimental, por lo cual el Método es Robusto.

4.6. Sesgo e Incertidumbre

En la tabla se consideran todos los contribuyentes de incertidumbre detectados durante la determinación de Fe

TABLA 50. Estimación de incertidumbre

			<i>wFe</i>	<i>wBCO</i>	<i>f_r</i>	<i>m_{alic}</i>	<i>m_{af}</i>	<i>m_{hari}</i>	<i>m_{dige}</i>	<i>β_{rep}</i>
								<i>na</i>	<i>stado</i>	
	Valor típico		0,3858	0,011685	0,8984	7,5085	15,0446	0,2548	25,0279	1,0000
	<i>u(x_i)</i>		0,00789	0,003779	0,0071	0,00009	0,00001	0,00006	0,00001	0,0130
	U	Tipo/Distribución	A/Normal	B/Rectangular	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal
<i>wFe</i>	m	0,39	0,39364	0,386	0,386	0,386	0,386	0,386	0,386	0,386
<i>wBCO</i>	m	0,01	0,0117	0,0155	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117
	g/g									
<i>f_r</i>		0,898	0,898	0,898	0,905	0,898	0,898	0,898	0,898	0,898
<i>m_{alic}</i>	G	7,5085	7,50852	7,50852	7,50852	7,50861	7,50852	7,50852	7,50852	7,50852
<i>m_{af}</i>	G	15,0446	15,04462	15,04462	15,04462	15,04462	15,04472	15,04462	15,04462	15,04462
<i>m_{harina}</i>	G	0,2548	0,25483	0,25483	0,25483	0,25483	0,25483	0,25544	0,25483	0,25483
<i>m_{digestado}</i>	G	25,0279	25,02790	25,02790	25,02790	25,02790	25,02790	25,02790	25,02804	25,02790
<i>β_{rep}</i>		1,0000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,01303
<i>γ(Fe)</i>	m	81,9447	83,6632453	81,1169	81,3064	81,9437	81,9452	81,7515	81,9451	83,0124
	g/g									
<i>(c_i·u(x_i))</i>	m		1,72	-0,83	-0,64	0,00	0,00	-0,19	0,00	1,07
	g/g									
<i>Σ(c_i·u(x_i))²</i>		5,223	2,9535	0,6851	0,4074	0,0000	0,0000	0,0373	0,0000	1,1400
<i>(c_i·u(x_i))²/Σ(c_i·u(x_i))²</i>	%	100%	56,5%	13,1%	7,8%	0,0%	0,00001%	0,71414%	0,00000%	21,8%
<i>c_i</i>			219,04	-219,04	-90,50	-10,91	5,45	-320,80	3,27	81,94
<i>v_{eff}</i>		40,21	25	2	9	100	100	100	100	17

Fuente. Elaboración propia

El sesgo se realizó comparando con una solución patrón de harina de soya NIST 3234

Por el método de Kratgen o método numérico de estimación de incertidumbre; donde se consideran todos los contribuyentes de incertidumbre como: w_{Fe} que es la concentración de Fe determinada; w_{BCO} es la concentración del blanco; f_r el factor de recuperación; m_{alic} masa de la alícuota digerida de 25 mg/ kg aprox.; m_{af} masa de aforo; m_{harina} masa de harina; β_{rep} reproducibilidad de la medición de Fe.

Posteriormente se determina la concentración de Fe en el material de referencia $\gamma(Fe)$, la contribución de la incertidumbre combinada $U(\gamma Fe)$ ($k = 2$) y $uc\gamma Fe$ contribución de la incertidumbre expandida de Fe mostrados en la tabla:

TABLA 51. Incertidumbre con respecto al material de referencia

$\gamma(Fe)$ (promedio)	82,06	mg/g
$uc(\gamma Fe)$	2,29	mg/g
$U(\gamma Fe)$ ($k = 2$)	4,57	mg/g

por otro lado, se estima las fuentes de contribución de incertidumbre en el procedimiento de cada ensayo.

TABLA 52. Contribución de fuentes de incertidumbre en %

Magnitud, X_i	$(c_i \cdot u(x_i))^2 / \sum (c_i \cdot u(x_i))^2$
w_{Fe}	56,54%
w_{BCO}	13,12%
f_r	7,80%
m_{alic}	0,00%
m_{af}	0,00%
m_{harina}	0,71%
$m_{digestado}$	0,00%
β_{rep}	21,8%
	100,00%

Fuente. Elaboración Propia

es así que se presenta una gráfica de contribución en la medición de Fe en MRC NIST

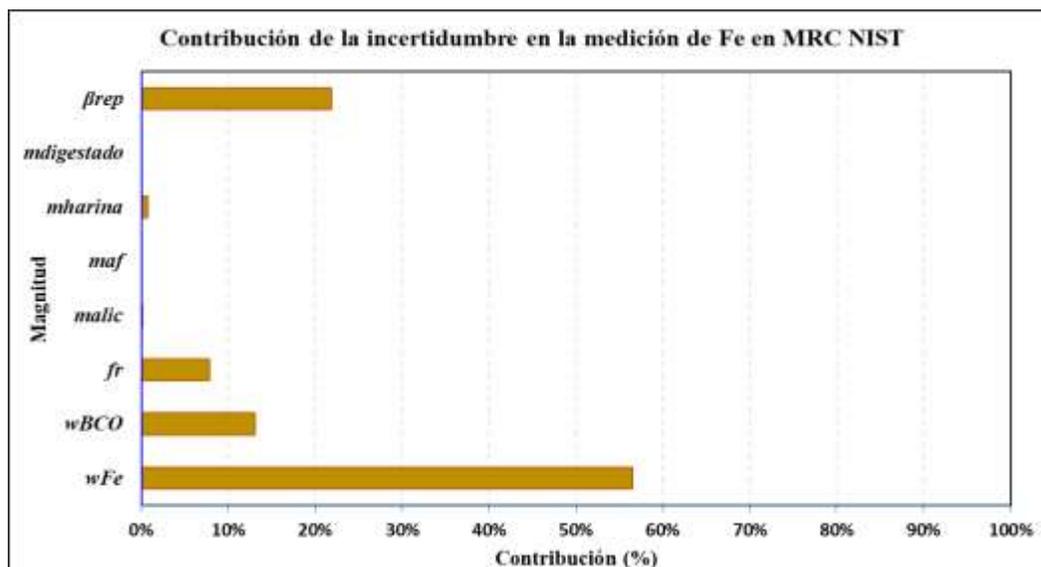


Figura 8. Contribución de fuentes de incertidumbre

Fuente. Elaboración Propia

– Estadísticamente se determina la fuente de incertidumbre

TABLA 53. Presupuesto de incertidumbre

Fuente de incertidumbre	Magnitud	x_{ix}	Unidades	Fuente de información	Incertidumbre estándar $u(x_i)$	c_i	Tipo/Distribución	Contribución ($c_i x_i$) $\mu\text{g/mL}$	n_i
Fración de masa de Fe en la curva de calibración	w_{Fe}	0,38580	mg/g	Regresión lineal	0,007846	219,04	A/Normal	1,72	25
Fración de masa de Fe en la muestra blanco	w_{BCO}	0,01169	mg/g	Mediciones repetidas	0,003779	-219,04	B/Rectangular	-0,83	2
Factor de recuperación	f_r	0,898	1	Experimental	0,0071	-90,49976	A/Normal	-0,64	9
Masa alicuota	m_{alic}	7,5085	G	Mediciones repetidas	0,0001	-10,913	A/Normal	0,00	100
Masa aforo	m_{af}	15,0446	G	Mediciones repetidas	0,0001	5,447	A/Normal	0,00	100
Masa alicuota 2da dilución	m_{harina}	0,2548	G	Mediciones repetidas	0,0006	-320,803	A/Normal	0	100
Masa aforo 2da dilución	$m_{digestado}$	25,0279	G	Mediciones repetidas	0,0001	3,274	A/Normal	0	100
Reproducibilidad de la medición de Fe	β_{rep}	1,0000		Mediciones repetidas	0,0130	81,945	A/Normal	0,22	17

Fuente. Elaboración propia

n_i	40	K	2,02
----------------------	-----------	----------	-------------

Por consiguiente, la incertidumbre expandida de fracción de masa de Fe mostrado en la siguiente tabla

TABLA 54. Incertidumbre Expandida

Fracción de masa de Fe		mg/g
		82,06
Incertidumbre estándar de Fe		2,29
Incertidumbre expandida de fracción de masa de Fe		4,62

U_{rel}(Fe)	5,6%
----------------------------	-------------

Se repite el procedimiento de determinación para la matriz de harina de quinua y harina de trigo mostrados en las tablas:

TABLA 55. Contribución de fuentes de incertidumbre

γ(Fe) (promedio)	49,12	mg/g
uc(γFe)	1,60	mg/g
U(γFe) (k = 2)	3,20	mg/g

TABLA 56. Contribución de fuentes de incertidumbre

Magnitud, x_i	(c_i.u(x_i))²/Σ(c_i.u(x_i))²
w_{Fe}	30,63%
w_{BCO}	7,12%
f_r	16,58%
m_{alic}	0,00%
m_{af}	0,00%
m_{harina}	0,06%
m_{digestado}	0,00%
β_{rep}	45,6%
	100,00%

✓ Contribución de incertidumbre en matriz de harina de Quinua.

TABLA 57. Método de Kratgen o Método numérico de estimación de incertidumbre

			wFe	wBCO	f_r	m_{alic}	m_{af}	m_{hari}	m_{dige}	β_{rep}
								na	stado	
	Valor típico		0,4499	0,011685	0,878	7,5145	15,0075	0,5036	25,0456	1,0000
	$u(x_i)$		0,0078	0,003779	0,01172	0,00009	0,00001	0,00004	0,00001	0,0218
	Unidades	Tipo/Distribucion	A/Normal	B/Rectangular	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal
WFe	mg/g	0,45	0,45772	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
wBCO	mg/g	0,01	0,0117	0,0155	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117
f_r	l	0,878	0,878	0,878	0,890	0,878	0,878	0,878	0,878	0,878
m_{alic}	G	7,5145	7,51451	7,51451	7,51451	7,51460	7,51451	7,51451	7,51451	7,51451
m_{af}	G	15,0075	15,00754	15,00754	15,00754	15,00754	15,00765	15,00754	15,00754	15,00754
m_{harina}	G	0,5036	0,50357	0,50357	0,50357	0,50357	0,50357	0,50397	0,50357	0,50357
m_{digestado}	G	25,0456	25,04558	25,04558	25,04558	25,04558	25,04558	25,04558	25,04571	25,04558
β_{rep}		1,0000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,02184
γ_(Fe)	mg/g	49,5484	50,43501129	49,1211	48,8962	49,5478	49,5488	49,5087	49,5487	50,6303
(c_i·u(x_i))	mg/g		0,89	-0,43	-0,65	0,00	0,00	-0,04	0,00	1,08
Σ(c_i·u(x_i))²		2,566	0,7860	0,1826	0,4254	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	1,1705
(c_i·u(x_i))²/Σ(c_i·u(x_i))²	%	100%	30,6%	7,1%	16,6%	0,0%	0,0000%	0,06162%	0,0000%	45,6%
c_i			113,07	-113,07	-55,66	-6,59	3,30	-98,32	1,98	49,55
v_{eff}		30,81	25	2	9	100	100	100	100	9

Fuente. Elaboración propia

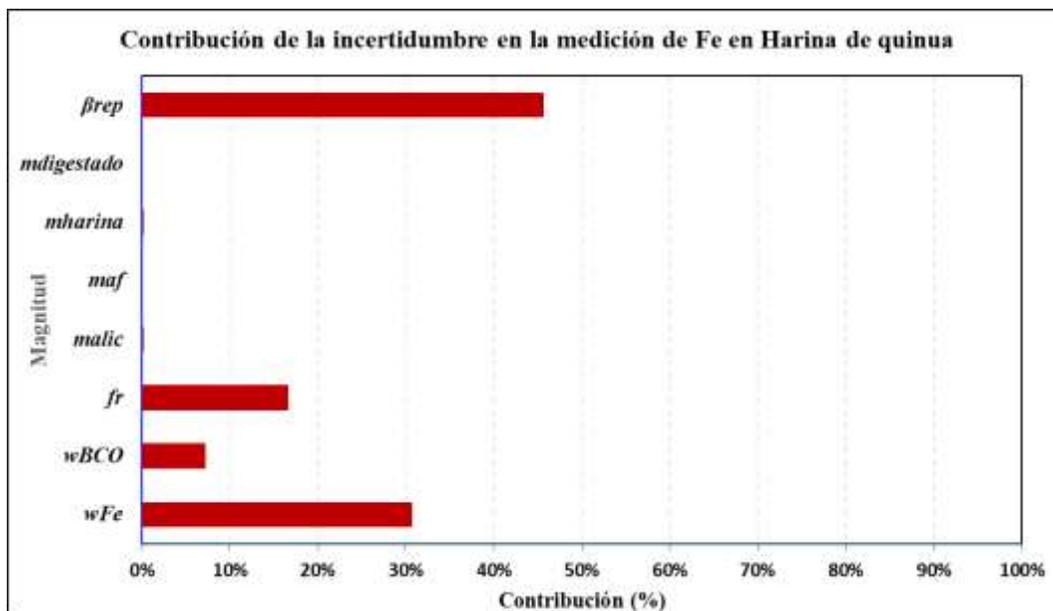


Figura 9. Contribución de fuentes de incertidumbre

Fuente. Elaboración Propia

TABLA 58. Presupuesto de Incertidumbre

Fuente de incertidumbre	magnitud	x_i	Unidades	Fuente de información	Incertidumbre estándar $u(x_i)$	c_i	Tipo/Distribución	Contribución $(c_i x_i)$ $\mu\text{g/mL}$	n_i
Fracción de masa de Fe en la curva de calibración	w_{Fe}	0,44988	mg/g	Regresión lineal	0,007841	113,07	A/Normal	0,89	25
Fracción de masa de Fe en la muestra blanco	w_{BCO}	0,01169	mg/g	Mediciones repetidas	0,003779	-113,07	B/Rectangular	-0,43	2
Factor de recuperación	f_r	0,878	1	Experimental	0,0117	-	A/Normal	-0,65	9
Masa alícuota	m_{alic}	7,5145	G	Mediciones repetidas	0,0001	-6,594	A/Normal	0,00	100
Masa aforo	m_{af}	15,0075	G	Mediciones repetidas	0,0001	3,302	A/Normal	0,00	100
Masa alícuota 2da dilución	m_{harina}	0,5036	G	Mediciones repetidas	0,0004	-98,316	A/Normal	0	100
Masa aforo 2da dilución	$m_{digestado}$	25,0456	G	Mediciones repetidas	0,0001	1,978	A/Normal	0	100
Reproducibilidad de la medición de Fe	β_{rep}	1,0000		Mediciones repetidas	0,0218	49,548	A/Normal	0,46	9

n_i	31	K	2,04
-------	----	---	------

Es así que se obtiene una incertidumbre expandida de fracción de masa de Fe mostrado en la tabla 59

TABLA 59. Incertidumbre Expandida

Fracción de masa de Fe		mg/g
		49,12
Incertidumbre estándar de Fe		1,60
Incertidumbre expandida de fracción de masa de Fe		3,27

$$\underline{\text{Urel(Fe)} \quad 6,7\%}$$

✓ **Contribución de incertidumbre de Fe en harina de trigo**

TABLA 60. Método de Kratgen o Método numérico de estimación de incertidumbre

			w_{Fe}	w_{BCO}	f_r	m_{alic}	m_{af}	m_{harina}	$m_{digestado}$	β_{rep}
	Valor típico		0,4825	0,011685	0,911	7,5162	15,0260	0,5014	25,0418	1,0000
	$u(x_i)$		0,0078	0,003779	0,01667	0,00009	0,00001	0,00001	0,00001	0,0230
	Unidades	Tipo/Distribucion	A/Normal	B/Rectangular	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal	A/Normal
w_{Fe}	mg/g	0,48	0,49033	0,482	0,482	0,482	0,482	0,482	0,482	0,482
w_{BCO}	mg/g	0,01	0,0117	0,0155	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117	0,0117
f_r	1	0,911	0,911	0,911	0,928	0,911	0,911	0,911	0,911	0,911
m_{alic}	g	7,5162	7,51621	7,51621	7,51621	7,51630	7,51621	7,51621	7,51621	7,51621
m_{af}	g	15,0260	15,02602	15,02602	15,02602	15,02602	15,02612	15,02602	15,02602	15,02602
m_{harina}	g	0,5014	0,50144	0,50144	0,50144	0,50144	0,50144	0,50151	0,50144	0,50144
$m_{digestado}$	g	25,0418	25,04178	25,04178	25,04178	25,04178	25,04178	25,04178	25,04191	25,04178
β_{rep}		1,0000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,02300
$\gamma_{(Fe)}$	mg/g	51,6027	52,46185252	51,1885	50,6750	51,6020	51,6030	51,5954	51,6030	52,7895
$(c_i \cdot u(x_i))$	mg/g		0,86	-0,41	-0,93	0,00	0,00	-0,01	0,00	1,19
$\Sigma(c_i \cdot u(x_i))^2$		3,179	0,7382	0,1716	0,8606	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	1,4085
$(c_i \cdot u(x_i))^2 / \Sigma(c_i \cdot u(x_i))^2$	%	100%	23,2%	5,4%	27,1%	0,0%	0,0000%	0,00164%	0,0000%	44,3%
c_i			109,60	-109,60	-55,63	-6,87	3,43	-102,90	2,06	51,60
v_{eff}		29,79	25	2	9	100	100	100	100	9

TABLA 61. Incertidumbre con respecto al material de referencia

$\gamma(\text{Fe})$ (promedio)	47,28	mg/g
$uc(\gamma\text{Fe})$	1,78	mg/g
$U(\gamma\text{Fe})$ (k = 2)	3,57	mg/g

TABLA 62. Contribución de la incertidumbre en la medición de Fe en Harina de trigo

Magnitud, x_i	$(c_i \cdot u(x_i))^2 / \sum (c_i \cdot u(x_i))^2$
w_{Fe}	23,22%
w_{BCO}	5,40%
f_r	27,07%
m_{alic}	0,00%
m_{af}	0,00%
m_{harina}	0,00%
$m_{\text{digestado}}$	0,00%
β_{rep}	44,3%
	100,00%

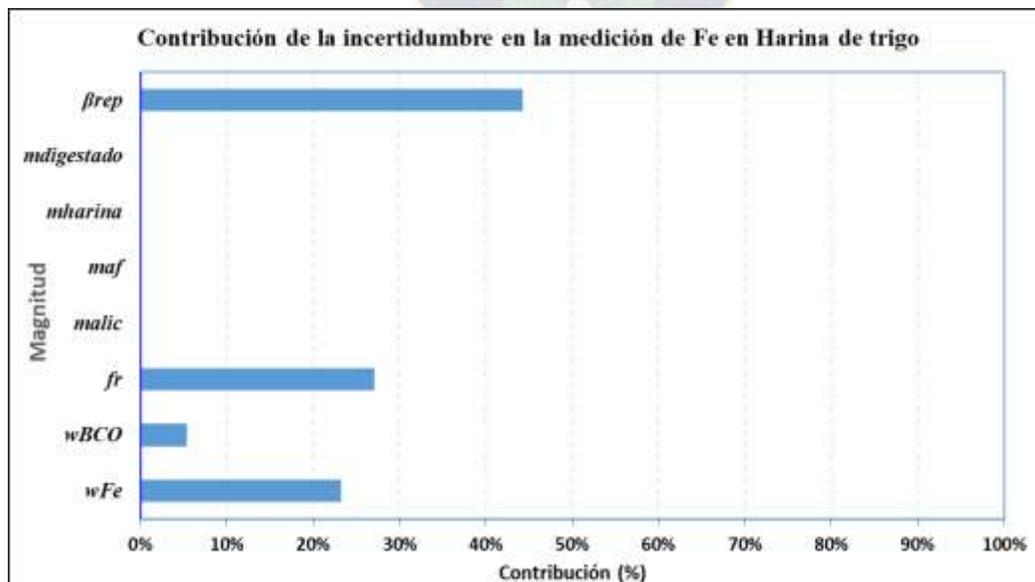


Figura 10. Contribución de la incertidumbre en la medición de Fe en Harina de trigo

Fuente. Elaboración propia

✓ **EXACTITUD**

Se determina la exactitud del método por diferencia de la incertidumbre del MRC menos la incertidumbre medida; si la diferencia es $\leq K\sqrt{u_{CRM}^2 + u_{med}^2}$

$$|x_{CRM} - X_{med}| \leq k \sqrt{u_{CRM}^2 + u_{med}^2}$$

Fracción de masa de Fe en harina			
x_{CRM}	80.3	u_{CRM}	1.4
x_{Med}	82.061	u_{Med}	2.285
K	2.02		

El sesgo del metodo no es significativo

$$\frac{\text{Diferencia}}{1.761} \leq 5,365$$

El criterio se cumple por lo que el sistema de medición tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia del rango estudiado.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo se ha realizado con la finalidad de que los resultados experimentales obtenidos en el Laboratorio de Unidad de Metrología Química en el Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) demuestren la Validez de la optimización del método de Determinación de fracción en masa de Fe por el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Atomización a la llama.

El método ha sido optimizado, utilizando en la determinación la Norma NB 39017 Harina de trigo - Método instrumental - Determinación de Fe (Primera revisión) y el Método de Análisis de la AOAC 985.35 Minerals in Infant formula, Enteral Products, and Pet foods. Atomic Absorption Spectrophotometric Method la incorporando a la misma la NB/ISO 329031 Productos alimenticios – determinación de elementos traza –determinación de Pb, Cd, Zn, Cu, Fe y Cr mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) Previo tratamiento de mineralización, y con requisitos que promueve la NB/ISO 680- Harina y derivados, la combinación de la metodología, resultado satisfactorio, sencillo y cuantitativo, posee precisión y exactitud, por lo cual se constituye en un método muy apropiado para ser empleado en diferentes muestras de Matriz de Harina; especialmente en Harina de Trigo y Quinoa.

Se demostró la linealidad del método obteniendo un coeficiente de correlación de 0,9996 como valor mínimo en las diferentes pruebas, evidenciando que existe una correlación entre los ejes X, Y. Adicionalmente, se verifico la selectividad del método con límites de detección de 0,09 y 0,16 mg Fe/ kg respectivamente; se estableció la selectividad analítica considerando la matriz analizada con y sin adición estándar obteniendo un factor de recuperación del 87% al 91% mostrando que el método es selectivo.

El parámetro de precisión, donde se determina la repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia según el valor del criterio de validación: en todos los niveles de concentración estudiados, reúne todas las condiciones apropiadas para el uso previsto del método validado en condiciones de repetibilidad, reproducibilidad interna.

El Método es Robusto. y finalmente el sesgo o desviación de linealidad del método no es significativo, por lo que se concluye que el método se encuentra optimizado y validado tomando en cuenta la ISO/IEC 17025:2017.



CAPITULO VI

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el trabajo con las pautas y modificaciones correspondientes establecidas según el procedimiento basado en la Norma NB 39017 Harina de trigo - Método instrumental - Determinación de Fe (Primera revisión) y el Método de Análisis de la AOAC 985.35 para la determinación de Fe por el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Atomización a la llama.

Mantener en almacenamiento de refrigeración la muestra una vez extraída mediante el procedimiento de digestión. La muestra de la matriz de Harina debe establecerse en condiciones ambientales controladas de manera que no se altere la concentración de Fe en la muestra.

La preparación de la muestra digerida se debe realizar con mucho cuidado para obtener satisfactoriamente parámetros de la validación como la Reproducibilidad y Repetibilidad en la matriz de harina.

En el parámetro de robustez, tener en cuenta que la variable temperatura es significativa, y esto se debe a que el procedimiento de digestión con respecto a la rampa de digestión es más óptimo bajo condiciones que indica establecidos en la metodología (**ANEXO 1**). Debido a que este procedimiento permite que la muestra llegue a ser digerida en su totalidad y lo que asegura que la muestra ha sido extraída sin efecto de reacciones orgánicas.

Debido al alto costo del material de referencia certificado (MRC) para la matriz de harina, como es el NIST, tomar los recaudos necesarios para su manipulación y considerar el empleo de un material de referencia Interno.

CAPITULO VII

7. BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez, B. (2010). Aspectos generales de la validación. Santiago.
2. ICCVAM. (2003), *Guidelines for the nomination and submission of new, revised and* .
3. EMAPA. 2014. Alimentos Fortificados y Enriquecidos. Bolivia. [en línea] <http://www.emapa.gob.bo/productos_02.php> [Consulta: 20 marzo del 2024]
4. SORAYA SANDOVAL. 2010. Instituto De Salud Pública: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación. Santiago, Chile. Diciembre. Pág. 10, 29, 30 – 51.
5. Entrevistas: INLASA, IBNORCA, EMAPA, Red de Micronutrientes . (2012). En MSYD. <http://www.emapa.gob.bo/productos_02.php> [Consulta: 20 marzo del 2024]
6. Fortificación De Harina De Trigo América Latina Y Región Del Caribe. (2004). En D. S. B.. Revista Chilena de Nutrición: Vol. 31, N°3, De F. Jorge David L. 3p.
7. Hugo Guerrero H, DTA. (2010) IBMETRO: Instituto Boliviano de Metrología – Dirección Técnica de Acreditación. Verificación y Validación de Métodos. Bolivia.
8. Guía EURACHEM. (2005). Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, México.
9. Guia Tecnica de Validacion . (2010). En *Aspectos generales sobre la Validacion de Métodos* (pág. 7).
10. ISO/IEC 17043, Evaluación de la conformidad — Requisitos generales para los ensayos de aptitud [Consulta: 24 junio del 2024]
11. ISO 17034, Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia. [Consulta: 02 abril del 2024]
12. Programa Nacional de Fortificacion de Alimentos . (1996). En B. 24420:1996. Bolivia
13. Reglamento Técnico de la Fortificación de la Harina de Trigo y Mezclas a Base de Harina de Trigo. (Consulta:04 de Julio.).
14. Association of Official Analytical Chemists (1990). Minerals in Infant Formula, Enteral Products, and Pet Foods: Atomic Absorption Spectrophotometric Method. En K. Helrich

- (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15a ed., pp 1110). Association of Official Analytical Chemists.
15. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad IBNORCA Norma Boliviana NB 39017. 2003-11-28. Harina de trigo - Método instrumental - Determinación de hierro (Primera revisión) (Anula y reemplaza a la norma NB 39017:2004)
 16. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad IBNORCA Norma Boliviana NB 680 y el Reglamento Técnico de la Fortificación de la Harina de Trigo y Mezclas a Base de Harina de Trigo, Abril 2011.
 17. Laboratory of the Government Chemist, London (2012). ISBN 978-0-948926-30-3. Also available from <http://www.eurachem.org>.
 18. Joint Committee for Guides in Metrology (2008). Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement (JCGM 100:2008).
 19. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Segunda Edición Inglesa Primera Edición Española Temas Relacionados.
 20. Ramis G, García MC. Quimiometría. Cap. 5. Validación de métodos analíticos. Ed. Síntesis. Madrid: España; 2001.
 21. EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998. (Consulta:10 de Julio de 2024.)
 22. Youden WJ, Steiner EH. Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC. International. Maryland USA. 8th printing 1997.
 23. Norma Boliviana NB/ISO 17034:2016. Requisitos Generales para la competencia de los productores de materiales de referencia.
 24. Instituto colombiano de normas técnicas y certificación - ICONTEC NTC 267 - Harina de trigo. (Consulta:14 de marzo de 2024.)

ANEXOS

ANEXO 1. Instructivo propuesto para IBMETRO de determinación de Hierro en Harinas

OBJETIVO

Establecer un método para la determinar el contenido de fracción en masa de Hierro en las harinas mediante Espectrometría de Absorción Atómica (EAA)

ALCANCE

Este procedimiento se describe el análisis para la determinación de Hierro en matrices alimentarias (harina de cereales).

REFERENCIAS

[1] NB 680 Harina y derivados - Harina de trigo – Requisitos.

[2] NB 329031 Productos alimenticios – Determinación de Plomo, Cadmio, Zinc, cobre, Hierro y cromo mediante Espectrometría de absorción atómica (EAA)Previo tratamiento de mineralización.

[3] NB 39017 Harina de Trigo- Método Instrumental –Determinación de Hierro.

[4] Método oficial AOAC 985.35 Minerales en fórmulas infantiles, productos enterales y alimentos para mascotas Absorción atómica Método espectrofotométrico

[5] **IBM-PE-198** Determinación Humedad.

DEFINICIONES

Contenido de Hierro: Se entiende como contenido de hierro en la harina, a todas las formas químicas inorgánicas u organometálicas en las que pueda estar el hierro.

REGISTROS GENERADOS

Identificación de registro		Conservación del registro				
Código	Nombre	Responsable	Criterio de ordenamiento	Lugar	Tiempo	Disposición
IBM-PE-xxx/F01	Determinación de Hierro	Laboratorio de química	Por fecha cronológica	Carpeta digital en laboratorio	Indefinido	Archivo central
IBM-PE-xxx/F02	Hoja de Cálculo Hierro	Laboratorio de química	Por fecha cronológica	Carpeta digital en laboratorio	Indefinido	Archivo central

RESPONSABLES

Los responsables del cumplimiento de este procedimiento son:

- Supervisor Metrología Química.
- Responsable de Laboratorio de Calibración y Material de Referencia.
- Técnico (s) del área de Metrología Química.

Actividades	Supervisor	Responsable	Técnico (s)
Preparación de las condiciones	Participa	Ejecuta	Ejecuta
Realización de mediciones	Ejecuta	Ejecuta	Ejecuta
Control de actividad	Ejecuta / Decide	Ejecuta	Ejecuta
Evaluación de resultados	Ejecuta / Decide	Ejecuta	Ejecuta

PROCEDIMIENTO

PRINCIPIO DEL METODO

La determinación del contenido de ion metálico hierro se realiza por absorción atómica con aspiración de llama aire/acetileno previamente calcinada la muestra para reducir la materia orgánica, convertir el metal unido orgánica o inorgánicamente, a su forma de metal libre.

PROCEDIMIENTO DE INVESTIGACION

El procedimiento de investigación que conlleva el presente trabajo, es de tipo experimental cuantitativo y estadístico. Previo a realizar el procedimiento, se recopila información teórica en temas de validación y procedimiento metodológico correspondientes a: la Norma Boliviana NB 329031 Determinación de elementos traza-Pb, Cd, Zn, Cu, Fe y Cr mediante EAA, la Norma Boliviana NB 39017 Determinación de Hierro en Harina de Trigo-Método Instrumental; así también el método de análisis de la AOAC 985.35; Determinación Espectrofotométrica para matrices orgánicas, Requisitos de la Norma Boliviana NB 680 Harina y Derivados-Harina de Trigo-Requisitos. Combinando la recopilación establecida se realiza un protocolo de determinación de Hierro en las Harinas con enfoque a la Validación correspondiente a la Norma Internacional ISO/IEC 17025:2017, Norma Española UN-EN-ISO/IEC ISO 17043:2023 Evaluación de la Conformidad Requisitos generales para los ensayos de aptitud, y la Norma Boliviana NB/ISO 17034:2016. Requisitos Generales para la competencia de los productores de materiales de referencia

METODOLOGIA ANALITICA

Para el procedimiento Analítico, todos los materiales de vidrio utilizados en el laboratorio fueron lavados con agua destilada y antes de ser usados se lavaron tres veces con agua destilada y tres veces con agua ultra purificada que se utiliza en el método de análisis.

- **Preparación de la muestra**

Las muestras en las que se realizarán los análisis deben ser de un tamaño de partícula aproximadamente de 0.5 mm.

- **Muestra**

Se debe homogenizar la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que lo contiene, no se debe exponer al aire mucho tiempo.

Se debe realizar el ensayo por duplicado.

- **Procedimiento de digestión de muestras de matriz orgánica de bajo contenido graso**

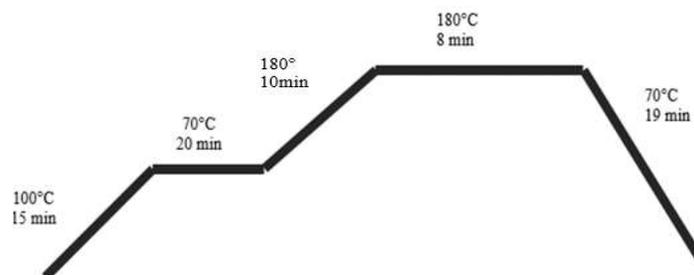
El procedimiento a seguir se basa en la “Medición de masa a través del pesado por diferencia”, que significa que a. el peso del recipiente vacío, b. el peso del recipiente con la sustancia, y c. el peso de la sustancia que se obtiene por diferencia, restando al peso del recipiente con la sustancia, y el peso del recipiente vacío, el cual se opta por la mínima fuente error en la determinación de la incertidumbre, Para la digestión de muestras de harina (matriz orgánica) se procede de la siguiente manera:

Pesar 0,5 g de muestra de harina en tubos de teflón para digestión por microondas, seguir el procedimiento de Medición de masa a través del pesado por diferencia. Anotar las masas medidas en la Bitácora de la Balanza.

Empleando Micropipetas adecuadas añadir 2 mL de HNO₃ concentrado y 1 mL de H₂O₂ al 30 % dentro la campana de gases.

Siguiendo las indicaciones del uso del horno de digestión de microondas, crear un método con la rampa que se presenta en la Figura 1:

Figura 1. Rampa de Digestión por el método de microondas



Por protocolo respaldado por el IBMETRO, se debe trabajar con al menos 8 muestras de una misma muestra y su respectivo blanco.

La solución obtenida por medio de la digestión Ácida por Microondas se deja enfriar; se recomienda dejar la muestra en reposo toda la noche para disminuir la presión de los gases generados dentro del tubo de digestión.

Concluido el tiempo se retira la tapa que tiene el tubo y posteriormente se traslada a la sala de balanzas, una vez la solución Digerida se encuentra en la sala de balanzas, se Transfiere la muestra cuantitativamente a frascos de PEAD, previamente esterilizados con la finalidad de evitar toda forma de vida microbiana, tanto patógena como saprofita por objetos inanimados y estar debidamente rotulados.

Se afora gravimétricamente la muestra con una solución de HNO₃ al 2% ya que la muestra será medida por EAA con sistema de atomización por flama

- **Preparación de disoluciones patrón para la curva de Calibración:**

Las disoluciones patrón para Fe, se preparan a través de un material de referencia certificado de Fe NIST SRM 3126, preparado a una concentración de 1013mg/kg, para luego preparar una solución de trabajo de 25 mg/ kg. Posteriormente realizar las respectivas diluciones presentadas en la tabla

Tabla 11. Preparación de la curva de calibración

Rango mg/kg	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Masa solución de Fe n a pesar para preparar 25 g de solución	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0

Fuente propia

Almacenar en un frasco de PEAD que debe tener rotulado el valor del estándar preparado, la fecha de preparación y fecha de validez.

Agitar el frasco para homogeneizar, sellar con para film los frascos que contienen los estándares, introducirlo en bolsas de aluminio y almacenarlas bajo refrigeración.

Las disoluciones de partida, disoluciones madre, remanentes se pueden guardar en un envase plástico, cerrar, etiquetar y almacenar. Estas soluciones son estables en condiciones de anaquel aproximadamente 6 meses.

Al realizar la lectura de las soluciones estándar para determinar la curva de calibración verificar el valor de R (coeficiente de correlación), que debe ser $\geq 0,995$.

La curva de calibración se repite en cada determinación.

DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN EN MASA DE Fe POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

Las lecturas se realizan en el Espectrómetro de Absorción Atómica con atomización con flama, a una absorbancia de 248,33 nm, para la obtención del Zero se realiza una solución de HNO₃ al 2%, que también es usado como solvente de las muestras preparadas en todas las muestras y las soluciones de calibración.

Mediante la ecuación se determina la fracción de Fe en la muestra Digerida:

$$\text{Donde: } W_{Fe} = [w_0 - w_{Bco}] * \frac{1}{f_r} * \frac{m_{af}}{m_{smp}} * \beta_{met}$$

w_0 = masa i

w_{Bco} = masa del blanco

f_r = Factor de recobro; factor de recuperacion

CÁLCULO Y EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El contenido de hierro presenta en la muestra de harina de trigo se expresa mediante la siguiente fórmula:

Masa de Fe, mg/kg Frasco

$$\frac{mg}{kg} Fe = mg Fe \text{ medido} * \frac{m \text{ muestra digestada}}{m \text{ muestra}}$$

Fe en, mg/kg Frasco seco

$$\frac{mg}{kg} Fe = \frac{mg}{kg} Fe_{frasco} * \frac{m \text{ muestra seca}}{m \text{ muestra humeda}}$$

ANEXOS

No existen anexos en el presente procedimiento

CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Versión	Cambio efectuado
2024-06-19	1	Elaboración del documento.

ANEXO 2. Certificados de calibración Termohigrobarómetro-calibración de Temperatura

Resultados de la calibración:

Hoja de registro LP - L - 0103 - 2023.

Calibración en Temperatura:

Valor indicado por el Patrón	Valor indicado por el instrumento bajo calibración	Corrección	Incertidumbre expandida
$t_p / ^\circ\text{C}$	$t_{bc} / ^\circ\text{C}$	$(t_p - t_{bc}) / ^\circ\text{C}$	$U_{exp} / ^\circ\text{C}$
15,1	15,0	0,1	0,65
20,1	20,1	0,0	0,65
25,1	25,1	0,0	0,65

La temperatura convencionalmente verdadera (TCV) resulta de la relación:

$$TCV = \text{Valor indicado por el instrumento bajo calibración} + \text{Corrección}$$

ANEXO 3. Certificado de Calibración de Humedad

Calibración en Humedad:

Temperatura referencial	Valor indicado por el Patrón	Valor indicado por el instrumento bajo calibración	Corrección	Incertidumbre expandida
$^\circ\text{C}$	$H_p / \%\text{HR}$	$H_{bc} / \%\text{HR}$	$(H_p - H_{bc}) / \%\text{HR}$	$U_{exp} / \%\text{HR}$
15,3	30,0	33,5	-3.5	3,00
	50,0	53,2	-3.2	3,00
	70,0	72,6	-2.6	3,00
25,1	30,1	32,7	-2.6	3,00
	50,0	52,7	-2.7	3,00
	70,0	71,9	-1.9	3,00

La humedad convencionalmente verdadera (HCV) resulta de la relación:

$$HCV = \text{Valor indicado por el instrumento bajo calibración} + \text{Corrección}$$

ANEXO 4. Certificado de Calibración de presión

Evaluación:

Valor ajustado en el patrón	Valor promedio del mensurando	Error del objeto		Repetibilidad	Histéresis	Incertidumbre expandida	
		hPa	% F.S.			hPa	% F.S.
550,0	549,43	0,45	0,04	0,10	0.10	0,1000	0,0053
600,0	599,65	0,76	0,07	0,00	0.30	0,1826	0,0091
650,0	649,43	0,63	0,06	0,50	0.60	0,4546	0,0166
700,0	699,48	0,63	0,06	0,10	0.40	0,2450	0,0413
750,0	749,40	0,50	0,05	0,20	0.90	0,5354	0,0223
800,0	799,58	0,62	0,06	0,30	1.00	0,6055	0,0487
850,0	849,80	0,80	0,07	0,40	0.40	0,3317	0,0550
900,0	899,98	0,92	0,08	0,30	0.10	0,1915	0,0302
950,0	950,10	0,99	0,09	0,00	0.20	0,1291	0,0174
1000,0	999,60	0,44	0,04	0,20	0.90	0,5354	0,0117

% F.S. Porcentaje de full scale (Porcentaje de alcance máximo)

Conversión de unidades: 1 hPa = 0,001 bar

ANEXO 5. certificado de calibración de la balanza

Resultados de medición

EXCENTRICIDAD

CARGA	ERROR MÁXIMO ENCONTRADO	ERROR MÁXIMO PERMISIBLE
50 g	0,0002 g	0,0010 g

REPETIBILIDAD

CARGA	REPETIBILIDAD (Desviación Estándar)	ERROR ENCONTRADO	ERROR MÁXIMO PERMISIBLE NB 23001
0,1 g	0,00000 g	0,0000 g	0,0010 g
100 g	0,00004 g	0,0001 g	0,0020 g
200 g	0,00000 g	0,0000 g	0,0020 g

LINEALIDAD

CARGA	ERROR ENCONTRADO	ERROR MÁXIMO PERMISIBLE NB 23001	INCERTIDUMBRE
0,1 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00008 g
0,5 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00012 g
1 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00012 g
2 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00012 g
5 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00012 g
10 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00013 g
20 g	0,0000 g	0,0010 g	0,00015 g
50 g	0,0002 g	0,0010 g	0,00025 g
100 g	0,0005 g	0,0020 g	0,00045 g
200 g	0,0007 g	0,0020 g	0,00087 g



ADVERTENCIA: El presente certificado autoriza el uso del instrumento para fines propios del solicitante. No constituye autorización legal de uso para la certificación metrológica a terceros y no puede ser reproducido sin la autorización escrita del IBMETRO, salvo que la reproducción sea total. El presente documento se emite de acuerdo a la Ley Nacional de Metrología (DL15380 de 1978-03-28).

ANEXO 6. Plan de Validación

PLAN DE VALIDACIÓN

1. DATOS DEL MÉTODO, REVISIÓN Y APROBACIÓN

Método análisis:	Medición de hierro en Harinas	Parámetro/analito:	Hierro
Estudio realizado por:	Nilda Elizabeth Mamani Campos	Fecha de realización:	29/01/2024
Aprobado por:	Jose Luis Gonzales	Fecha de aprobación:	19/03/2024

2. MATRIZ Y FORMA

La muestra consiste en candidato a material de referencia elaborados a partir de dilucion gravimetrica utilizando MRC de hierro. matriz es solucion acuosa de HNO3 al 2%.

3. PROPÓSITO DE LOS ENSAYOS/MEDICIONES

Certificacion de Material de Referencia de hierro en Harinas.

4. OBJETIVO DEL ESTUDIO

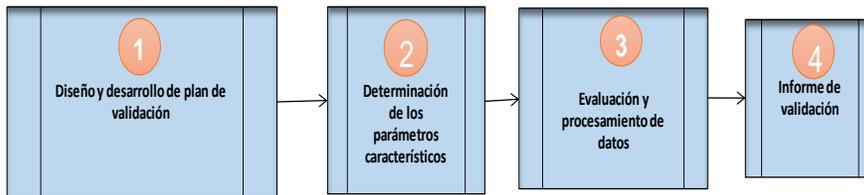
- Validación del cambio de alcance de un método.

Descripción
adicional
(si aplica):

Evaluar los parámetros de validación del método de determinación de fracción de masa de hierro en harinas fortificadas por la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con sistema de atomización por flama para su uso en certificación de materiales de referencia en ensayos de aptitud.

5. METODOLOGÍA

Las principales actividades a desarrollarse son:



5 CONTROL DEL PROCESO

5.1 DEFINICIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO A SER ESTUDIADAS

Seguindo los las directrices del procedimiento para la determinación de Hierro en harinas, las características de desempeño a ser estudiadas son los que se muestran a continua

Tabla 1: Características de desempeño a ser estudiados y diseño de la mediciones

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO	REQUISITOS ESPECIFICADOS (¿Cómo debe funcionar el método para ofrecer resultados que sean adecuados para su propósito?)		OTRAS CONSIDERACIONES (Se requiere muestreo/submuestreo (y esto se realizará dentro del laboratorio)? ¿Existe alguna restricción en cuanto al tamaño de la muestra?)	
	VALORES OBJETIVO	REQUISITO DEFINIDON POR		
		SELECCIONE		DESCRIPCION ESPECÍFICA DE LA FUENTE DEL REQUISITO
Rango de Trabajo (RT)	$LIT \leq 0,1 \text{ mg/kg}$ hasta $1,8 \text{ mg/kg} \geq LST$	Experiencia del laboratorio	De acuerdo a la Norma Boliviana NB 680 la concentración mínima permitida de hierro en harinas 30 mg/kg.	
Rango Lineal (RL)	$LIT \geq 0,14 \text{ mg/kg}$ hasta $8 \text{ mg/kg} \leq LST$	Requisitos de métodos normalizados	La norma ASTM D 1068 – 03 indica un rango de 0,1 mg/L a 5,0 mg/L se considera que la concentración mas baja del rango de trabajo y la concentración mas alta del rango indicado según la norma deberían estar contenidos en una curva de calibración lineal.	
Límite de detección (LD)	$LD \leq LC$	Experiencia del laboratorio	Se realizaron estudios del LD y LC en otros metales en la misma matriz y el LD siempre es menor al LC.	
Límite de cuantificación (LC)	$LC \leq LIT$ $LC \leq 0,05 \text{ mg/L}$	Experiencia del laboratorio	Se realizaron estudios del LC en otros metales en la misma matriz y el LC siempre es menor al punto de menor concentración de la curva de calibración.	
Repetibilidad (Sr)	$S_r \leq \frac{\sigma_r \cdot \sqrt{X_i^2 - \alpha_i}}{\sqrt{v}}$ $S_{r,max} = 5\%$	Requisitos de métodos normalizados	NB 329031 establece limite máximo de repetibilidad	
Reproducibilidad interna (SL)	$S_L \leq \frac{\sigma_L \cdot \sqrt{X_i^2 - \alpha_i}}{\sqrt{F}}$ $S_{L,max} = 5\%$	Requisitos de métodos normalizados	NB 329031 establece limite máximo de reproducibilidad	
Sesgo (δ)	$ X_{mediana} - X_{CRM} \leq M \sqrt{u_{mediana}^2 + u_{CRM}^2}$	Publicaciones	De acuerdo a la Guía ISO 33 se puede usar MRC para evaluar el sesgo de un metodo de medición.	
Selectividad especificidad	Rango de factor de recobro de 0,85 a 1,15	Experiencia del laboratorio	Se realizara una prueba mediante adición de estándar, los factores de recobro deben cumplir el criterio.	
Robustez	No aplica	Publicaciones	(colocar referencia de EURACHEM o Youden Steiner)	
Incertidumbre	$U_{rel} \leq 12,21 \%$	Publicaciones	Incertidumbre de hierro en harina de trigo del Ensayo de Aptitud EQ-0147 Harina de Trigo organizado por IBMETRO	

5. 2 RECURSOS

Los principales recursos para la implementación del plan son equipo de medición, material de vidrio, reactivos, materiales de referencia, instalaciones, condiciones ambientales,

N°	Equipo/código	Verificado (SI/NO)	Calibrado (SI/NO)	Fecha de última verificación	Fecha de última calibración	Equipo utilizado en la medición o ensayo de:
1	Campana extractora de gases. Q-OE-06	N/A	SI	04/12/2023	20/11/2023	condiciones ambientales del laboratorio
2	Espectrofotómetro de absorción atómica / Q-PT-01	SI	NO (Aplica calificación)	11/01/2024	11/01/2024	Equipo para la medición de la concentración de hierro en harinas.
3	Horno de digestión por microondas. Q-EA-15	N/A	N/A	-	-	Equipo para la medición de la concentración de hierro en harinas.
4	Micropipeta de 5000 µL / Q-EM-05	N/A	N/A	05/10/2023	20/09/2023	Medición de alícuotas para preparación volumétrica de soluciones de calibración
5	Balanza analítica Q-EM-01	SI	SI	05/10/2023	20/09/2023	pesada por diferencia
6	Estufa de secado. Q-EA-05	N/A	SI	05/10/2023	20/09/2023	determinación de humedad.
7	Calentador agitador magnético. Q-EA-54	N/A	N/A	05/10/2023	20/09/2023	homogenización de la matriz

Tabla 3: Material de vidrio

N°	Tipo de material	Verificado (SI/NO)	Calibrado (SI/NO)	Volumen nominal	Clase	Equipo utilizado en la medición de:
1	Matraz volumétrico	SI	SI	1000	A	Aforo de soluciones de calibración
5	Pipeta volumétrica	SI	SI	5	A	Toma de alícuotas para dilución volumétrica
6	Probeta	SI	SI	100	A	Medición de volumen de solvente (HNO ₃ al 2%)
7	Vaso de precipitado	NO	NO	100	N/A	Contención de soluciones de calibración

Tabla 4: Reactivos

N°	Reactivo	Concentración	Usado en la medición o ensayo de:	Otras características
1	Acido nítrico	65.00%	Usado para preparar el solvente de ácido nítrico al 2% para todas las muestras y las soluciones de calibración	Frasco ámbar en condiciones ambientales
2	Agua desionizada	N/A	Usado en la medición de la preparación de solvente de ácido nítrico y lecturas del equipo de AA	Agua de Tipo I
3	Peroxido de Hidrogeno	30%V/V	Usado como insumo para la digestión de muestras de Harina	De grado analítico

Tabla 5: Material de referencia

N°	Nombre/Código	Matriz	Tipo de material/Concentración	Otras características
1	NIST 3234-Harina de Soya	Solucion acuosa de Acido nítrico al 10 %	De matriz 80,3mg/g de hierro	Material de Referencia Certificado, procedencia: NIST Estados Unidos
2	Harina de Trigo MRC 125	Solucion acuosa de Acido nítrico al 2 %	De matriz, 46,13 mg/kg de hierro	Material de Referencia Certificado de matriz, procedencia: IBMETRO
3	Harina de Quinoa MRC 108	Solucion acuosa de Acido nítrico al 2 %	De matriz, 50,49 mg/kg de hierro	Material de Referencia Certificado de matriz, procedencia: IBMETRO

Tabla 6: Instalaciones y condiciones ambientales

N°	Areas/Código	Orden y limpieza	Control de acceso	Temperatura	Humedad relativa	Actividad en la que se usa
1	Laboratorio de química inorganica / Área 5	Si	Si	15°C a 28°C	20% a 60%	Medición de la concentración de hierro en harinas
2	Sala de preparacion de muestras / Área 4	Si	Si	15°C a 25 °C	20% a 60%	Preparacion de las muestras y soluciones de calibracion
3	Área de recepcion de muestras / Área 1	Si	Si	15°C a 25 °C	20% a 60%	Recepcion de muestras de clientes
4	Almacen de muestras / Área 2	Si	Si	15°C a 25 °C	20% a 60%	Almacenamiento de muestras y muestras retenidas
5	Almacen de reactivos / Área 3	Si	Si	15°C a 25 °C	20% a 60%	Almacenamiento de reactivos

Tabla 8: Otros materiales

N°	Tipo de material	Cantidad	Usado en la medición o ensayo de:	Otras características
1	Piseta	3	Usado en la preparacion de muestras y soluciones de calibracion	Hecha de plastico PEAD, volumen de 250 mL.
2	Tips para micropipeta	25	Usado en la preparacion de muestras y soluciones de calibracion	plastico resistente a químicos, compatible con micropipeta d

Tabla 9: Personal

N°	Cargo	Nombre y apellido	Calificación/supervisión	Participa en la ejecución de:
1	Técnico	Nilda Mamani	Calificacion con evaluacion de desempeño	Medición y preparacion de muestras
2	Técnico	Julian Morales	Calificacion con evaluacion de desempeño	Medición
3	Técnico	Maria Eugenia	Calificacion con evaluacion de desempeño	Medicion
4	Análisis de datos	Nilda Mamani	Calificacion con evaluacion de desempeño	Análisis estadístico de datos
5	Supervision	Jose Luis Gonzales	Supervision anual mediante auditoria interna	Supervisión de la medición y firma del informe de ensayo

ANEXO 7. Análisis de residuales

NOMBRE	x	y	y	y	x ²	xy	CONCENTRACION
	w, mg/kg	Absorbancia	Absorbancia corr	Absorbancia promedio			
MR1	0.241	0.011239547	0.011239547	0.011	0.058131655	0.00270991	0.22888
	0.220	0.011364114	0.011364114		0.058131655	0.00270991	0.23166
	0.232	0.011379542	0.011379542		0.058131655	0.00270991	0.23200
MR2	0.462	0.021141733	0.021141733	0.021	0.213742219	0.00977430	0.45009
	0.456	0.020767243	0.020767243		0.213742219	0.00977430	0.44172
	0.461	0.02155075	0.021550750		0.213742219	0.00977430	0.45923
MR3	0.631	0.028850596	0.028850596	0.029	0.398661924	0.01821617	0.62230
	0.613	0.029476485	0.029476485		0.398661924	0.01821617	0.63629
	0.642	0.028968289	0.028968289		0.398661924	0.01821617	0.62493
MR4	0.851	0.038257093	0.038257093	0.039	0.723434469	0.03253955	0.83244
	0.843	0.039698677	0.039698677		0.723434469	0.03253955	0.86465
	0.850	0.039448694	0.039448694		0.723434469	0.03253955	0.85907
MR5	1.035	0.047237804	0.047237804	0.047	1.071627824	0.04890032	1.03307
	1.000	0.047153591	0.047153591		1.071627824	0.04890032	1.03119
	1.040	0.047307656	0.047307656		1.071627824	0.04890032	1.03463
MR6	1.265	0.056534752	0.056534752	0.057	1.599309097	0.07149599	1.24077
	1.250	0.056777045	0.056777045		1.599309097	0.07149599	1.24618
	1.247	0.056908656	0.056908656		1.599309097	0.07149599	1.24912
MR7	1.466	0.067443168	0.067443168	0.067	2.149598896	0.09888187	1.48446
	1.450	0.067133688	0.067133688		2.149598896	0.09888187	1.47755
	1.462	0.067513117	0.067513117		2.149598896	0.09888187	1.48602
MR8	1.645	0.073891507	0.073891507	0.074	2.705465161	0.12153895	1.62851
	1.624	0.073896977	0.073896977		2.705465161	0.12153895	1.62864
	1.635	0.073965333	0.073965333		2.705465161	0.12153895	1.63016
MR9	1.861	0.083614086	0.083614086	0.084	3.464900156	0.15564129	1.84572
	1.863	0.083138835	0.083138835		3.464900156	0.15564129	1.83510
	1.840	0.083861096	0.083861096		3.464900156	0.15564129	1.85123
Sumatoria	28.1856		1.2885				28.1856
Promedio	1.0439		0.0477				1.0439

$S_{xx} S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$	Residual, S_y S = $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_{est})^2}{n-2}}$
7.731328893	0.000662248

b ₁	b ₀
0.044763	y-mx
	0.000994424

Valor x=(y0-b)/m correspondiente a la respuesta y0	u curva $u_{(y_x)} = \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(y_{(x)} - \bar{y}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$
0.657509204	0.008625287
u relativo	1.31%

ANEXO 8. Datos de muestras digeridas para el parámetro de selectividad

Secuencia	Ab s 1	Ab s 2	Ab s 3	Ab s 4	Ab s 5	Abs promedio	w_0 $x = (y_0 - b)/m$ (mg/kg)	$(m_m + AE - m_m)$	w Fe, mg/kg	mali c	maforo	G<Geritico	DATO ACEPTADO
Q1+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.43	0.7 8	0.55	7.51	15.02	- 0.0 3	DATO ACEPTADO
Q1 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 4	0.03	0.76	4.92					
Q1 MR +	0.0 3	0.0 4	0.0 3	0.0 3	0.0 4	0.03	0.76	4.86					
Q1+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.44	0.7 8	0.57	7.51	15.02	0.7 3	DATO ACEPTADO
Q2+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.42	0.7 6	0.55	7.52	15.04	- 0.2 3	DATO ACEPTADO
Q2 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.73	4.74					
Q2 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.73	4.64					
Q2+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.42	0.7 4	0.56	7.52	15.04	0.4 3	DATO ACEPTADO
Q3+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.44	0.7 4	0.59	7.52	15.05	1.7 0	DATO ACEPTADO
Q3+ MR	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.74	4.65					
Q3+ MR	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.74	4.70					
Q3+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.43	0.7 5	0.58	7.52	15.05	1.1 7	DATO ACEPTADO
Q4+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.41	0.7 6	0.54	7.51	15.04	- 0.4 9	DATO ACEPTADO
Q4 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.73	4.75					
Q4 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.74	4.86					
Q4+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.41	0.7 8	0.53	7.51	15.04	- 0.9 2	DATO ACEPTADO
Q5+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.42	0.7 8	0.53	7.51	15.01	- 1.0 1	DATO ACEPTADO
Q5 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.74	5.38					
Q5 MR +	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.03	0.74	5.45					
Q5+H	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.0 2	0.02	0.42	0.7 9	0.53	7.51	15.01	- 1.3 7	DATO ACEPTADO

ANEXO 9. Modelo de iteración para el parámetro de repetibilidad

MODELO CONSTANTE			MODELO LINEAL			MODELO LINEAL INTERSECCIÓN EN CERO			MODELO POTENCIAL			MODELO CUADRÁTICO			
Nº	S _r	S _r [*]	Nº	S _r [*]	(S _r - S _r [*]) ²	Nº	S _r [*]	(S _r - S _r [*]) ²	Nº	S _r [*]	(S _r - S _r [*]) ²	Nº	S _r [*]	(S _r - S _r [*]) ²	
1	45,93	1,356	0,875	1	1,001	0,1255	1	0,757	0,357893	1	0,9168	0,19248	1	1,09231	0,06929
2	50,37	0,543	0,875	2	0,957	0,1710	2	0,831	0,082479	2	0,8698	0,10659	2	1,05151	0,25823
3	79,33	0,727	0,875	3	0,668	0,0035	3	1,308	0,337562	3	0,6715	0,00309	3	0,58117	0,02128
4			0,875	4	1,460	2,1310	4			4			4	1,27453	1,62443
5			0,875	5	1,460	2,1310	5			5			5	1,27453	1,62443
SEE		0,4259		SEE	1,2332		SEE	0,8820		SEE	0,54968		SEE	1,09509	

ANEXO 10. Símbolos y abreviaciones

- x_i = Mediciones individuales (que va desde k=1 hasta n)
 \bar{X} = Media aritmética de las mediciones individuales
 S = Desviación estándar de las mediciones individuales
 CV = Coeficiente de variación en %
 G = Test de Grubbs experimental
 G_{crit} = Test de Grubbs tabulado

$$G_{crit} = \frac{N-1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{t_{\alpha/2n; N-2}^2}{N-2 + t_{\alpha/2n; N-2}^2}}$$
 h = Test de Mandel experimental
 h_{crit} = Test de Mandel tabulado

$$h_{crit} = \frac{(N-1)r}{\sqrt{N(t^2 + N-2)}}$$
 t = Test de Student con N-2 grados de libertad a 95% de probabilidad
 N = Número personas que participaron en el estudio por cada nivel de concentración (que va desde i=1 hasta N)
 S_L = Desviación estándar de reproducibilidad interna
 S_{EG} = Desviación estándar de entre los grupos
 S_r = Desviación estándar de repetibilidad
 r_L = Límite de reproducibilidad interna
 \bar{X} = Media aritmética por cada nivel de concentración de \bar{X}
 T = Grados de libertad
 n = Número de medio de las mediciones individuales
 \bar{n} = Número de mediciones individuales (en la ecuación p=N=
$$\bar{n} = \frac{1}{p-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^p N_i - \frac{(\sum_{i=1}^p N_i)^2}{\sum_{i=1}^p N_i}}{\sum_{i=1}^p N_i} \right]$$
 $\chi^2_{((1-\alpha); v)}$ = Valor del estadístico Chi-Cuadrado con $\alpha=0,05$ y $U \square$
 σ_R = Estimación del valor de verificación de la dispersión del método en función del modelo de Horwitz, según ISO 13528
 $Criterio_V$ = Criterio de validación
 C = Es el valor de \bar{X} en fracción másica para el modelo de Horwitz

ANEXO 11. Certificado de estancia en IBMETRO



INSTITUTO BOLIVIANO
DE METROLOGÍA



ESTADO PLURINACIONAL DE
BOLIVIA

MINISTERIO DE DESARROLLO
PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL

CERTIFICADO DE PASANTÍA
DAF/RRHH N° 0013/2024

La suscrita **DIRECTORA GENERAL EJECUTIVA a.i. DEL INSTITUTO BOLIVIANO DE METROLOGIA - IBMETRO.**

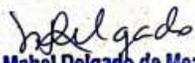
CERTIFICA QUE:

La señorita **Nilda Elizabeth Mamani Campos** con C.I. **7046981 LP.**, realizó sus Prácticas Profesionales desde el 11 de diciembre de 2023 hasta el 11 de marzo de 2024, en la **DIRECCIÓN DE METROLOGÍA INDUSTRIAL Y CIENTÍFICA**, cumpliendo con una carga horaria de 480 horas académicas.

En el periodo de tiempo, la señorita demostró compromiso, puntualidad, desempeño y responsabilidad en todas las actividades encomendadas.

Es cuanto certifico para fines que convengan a la interesada.

La Paz, 18 de abril de 2024


Mabel Delgado de Meave
DIRECTORA GENERAL EJECUTIVA a.i.
INSTITUTO BOLIVIANO DE METROLOGÍA
IBMETRO



"2023 AÑO DE LA JUVENTUD HACIA EL BICENTENARIO"

LA PAZ: Av. Camacho N° 1488 - Telf./Fax (+591 2) 2372046, 2310037, 2147945
COCHABAMBA: Calle Tumusla N° 510 Esq. México - Telf./Fax (+591 4) 4520856
SANTA CRUZ: Calle Combate Bella Flor N° 3230 - Telf./Fax (+591 3) 3410922
SUCRE: Parque Tecnológico Lajastambo (Carretera Sucre - Ravelo) Telf. (+591) 71559129

RIBERALTA: Av. Juan Carlos Menini N° 666 - Telf. (+591) 67359342
COBIJA: Carretera Porvenir, km 14,5 Zona Franca - Telf. (+591) 71525861
TARIJA: Calle Isaac Attie, entre Av. V. Paz y calle Avaroa, Edificio Familia Medina - Telf./Fax (+591 4) 6658866

800-10-9999

info@ibmetro.gob.bo

www.ibmetro.gob.bo

ANEXO 12. Archivo fotográfico 1. Limpieza de tubos de digestión



Archivo fotográfico 2. Pesada de tubos de digestión



Archivo fotográfico 3. Preparación de la muestra digerida



Archivo fotográfico 4. Horno de Digestión



Archivo fotográfico 5. Muestras preparadas para determinación de Hierro



Archivo fotográfico 6. Muestras madre



Archivo fotográfico 7. Medición en el equipo EAA

