# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA LEÓN



MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA AL ANÁLISIS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD

# DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO

Elaborado por: Lic. Carlos Iván Roque Zavala

Tutor : Dr. Gustavo Marcial Delgado

> León, Nicaragua Marzo 2010

# ÍNDICE

		Página
	RESUMEN	2
0	INTRODUCCIÓN	4
1	OBJETIVOS	7
2	REVISIÓN DOCUMENTAL	8
2.1	Toxicología	8
2.2	Metodologías de análisis para la confirmación de intoxicaciones por fosfuro de aluminio	12
2.3	Metodologías espectrofotométricas de absorción atómica para la determinación de aluminio en especímenes biológicos	15
2.4	Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito'	17
2.5	Propiedades químicas del fosfuro de aluminio y sus productos de hidrólisis	29
2.6	El aluminio	32
2.7	La Matriz biológica: el contenido gástrico	42
2.8	Factores para el desarrollo de un método analítico de determinación de aluminio en contenido gástrico	43
3	FACTIBILIDAD	59
4	METODOLOGÍA	60
4.1	Requerimientos técnicos	60
4.2	Procedimiento	65
4.2.1	Identificación de Factores	65
4.2.2	Pruebas de Desarrollo	68
4.2.3	Pruebas de Validación	79
5	RESULTADOS	109
5.1	Pruebas de desarrollo	109
5.2	Pruebas de validación	128
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	152
7	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	153
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

## Resumen

La determinación del fosfuro de aluminio es un ensavo de alta demanda en el Laboratorio Químico Toxicológico de Honduras. Para su realización se desarrolló en el año 2003 una metodología por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, la cual ha sido recomendada como prueba alternativa<sup>5</sup>, demostrando capacidad discriminatoria entre las concentraciones de aluminio en contenidos gástricos de individuos que ingirieron el fumigante y de aquellos que murieron por causas ajenas. Esta metodología presentó eventualmente inestabilidad en varios parámetros de desempeño, principalmente la linealidad, recuperación y precisión. Se analizaron las causas identificándose el asintotismo en las curvas de calibración. efectos de matriz y de la dilución como factores críticos. Se rediseñó el método optimizando las condiciones experimentales para mejorar la curvatura de la línea de calibración y evaluándose enfáticamente el efecto de matriz y de la dilución sobre la linealidad y recuperación. Cuando hay efecto de matriz en las mediciones se recomienda recurrir al método de adición de patrón; sin embargo, fue posible desarrollar un modelo de ajuste para corregir tal efecto y medir por simple interpolación. Se estudió el efecto no lineal de las diluciones y se desarrolló un modelo de ajuste para reducir el sesgo de la medición. Se estableció un límite de decisión por experimentos de simulación de Monte Carlo partiendo de un conjunto reducido de especímenes reales. El proyecto culminó con la validación del método, comprobando su adecuación para confirmar las intoxicaciones por ingestión de fosfuro de aluminio.



# 0. Introducción

Durante la presente década, se ha observado en Honduras un frecuente uso del fosfuro de aluminio con fines suicidas. Esta situación no es exclusiva y el problema prevalece en otros países, tales como Nicaragua<sup>1</sup>, Irán<sup>2</sup>, India<sup>3</sup> y Marruecos<sup>4</sup>, inclusive hay antecedentes en Francia, Turquía y Alemania<sup>5</sup>.

El fosfuro de aluminio libera la fosfina, que es el verdadero tóxico, al reaccionar con el agua o los ácidos fuertes. El comportamiento toxicológico de la fosfina en el organismo aún no ha sido del todo dilucidado y debido a su recurrente incidencia ha venido a representar un reto para la toxicología forense.

Existen varios métodos de ensayo para identificar la fosfina en fluidos biológicos. Los ensayos químicos de coloración para detectar el ión fosfuro son los más accesibles pero pueden ser relativamente complejos, los límites de detección no siempre resultan satisfactorios y su carácter es presuntivo. También se ha recomendado la cromatografía de gases con detección termoiónica (NPD) como técnica electiva. Ambas técnicas pueden considerarse adecuadas según el propósito destinado.

Actualmente, el Laboratorio Químico Toxicológico de Honduras, no cuenta con un cromatógrafo con detector NPD instalado y los ensayos químicos aplicados rutinariamente dejaron una larga historia de falsos negativos y falsos positivos en proporciones inaceptables. En el año 2003 se desarrolló una metodología que demostró capacidad para diferenciar significativamente entre las concentraciones de aluminio en contenidos gástricos de individuos que ingirieron fosfuro de aluminio y aquellos que murieron por causas ajenas a la intoxicación (hechos de tránsito, arma de fuego y otras)<sup>6</sup>. Esta metodología presentó con el tiempo inestabilidad en los parámetros de desempeño y para corregir los problemas presentados se hicieron cambios continuos e inconsistentes en las condiciones analíticas. Las fallas más comúnmente reportadas fueron la recurrencia de valores por encima del rango de trabajo, curvas de calibración excesivamente asintóticas y problemas de exactitud en los resultados. Para una investigación más sistemática, se han identificado los aspectos a optimizar o rediseñar en la presente metodología.

### a) Rango efectivo de trabajo

Cuando el método fue desarrollado se evaluó un grupo de 7 de especímenes provenientes de individuos que murieron por ingestión de comprimidos de fosfuro de aluminio. El valor promedio de aluminio encontrado en muestras diluidas fue de 3226,3 µg/L, con un rango de 2127 µg/L a 3646 µg/L y un caso atípico con 109200 µg/L, estas muestras fueron tratadas conforme al procedimiento desarrollado (mezclar 1,0 g de contenido gástrico con 10 mL de solución acuosa de ácido clorhídrico al 10%). En tanto que los valores en un grupo de 146 de especímenes provenientes de individuos que murieron por otras causas, por ejemplo hechos de



tránsito o heridas con armas de fuego, fue de 239,0  $\mu$ g/L, con un rango de 0  $\mu$ g/L a 749  $\mu$ g/L. Se definió entonces un rango de trabajo entre 200  $\mu$ g/L y 3000  $\mu$ g/L.

Posteriormente, con el método en marcha, los especímenes analizados sobrepasaban el límite de linealidad establecido en el procedimiento normativo, precisando llevar un número laborioso de diluciones. Realizando un cálculo con estos nuevos valores encontrados, se estima que la concentración promedio de aluminio total en muestras diluidas de contenido gástrico es 6077  $\mu$ g/L ± 924,6  $\mu$ g/L. Es necesario entonces establecer un nuevo rango de trabajo y adaptar la metodología a estos nuevos valores.

### b) Curvatura en los gráficos de calibración

Aún en los sistemas acuosos, debido a los altos niveles de concentración, las curvas de calibración de aluminio resultan con un excesivo asintotismo y fallas en la linealidad. La linealidad del rango entre 200  $\mu$ g/L a 3000  $\mu$ g/L resulta inestable. Es por tanto preciso estudiar los factores que influyen en la relación concentración-respuesta, e inclusive considerar el uso de otros modos de calibración diferentes al de regresión lineal simple y ajustar el procedimiento a un rango lineal más apropiado.

### c) Pretratamiento de las muestras

Un tercer problema encontrado en la metodología en estudio radica en el procedimiento de pretratamiento de la muestra.

Anteriormente el pretratamiento consistía en homogenizar el contenido gástrico y pesar una cantidad aproximada de 1,0 g en un tubo de vidrio cónico, previamente lavado con ácido nítrico al 50%. El peso experimental se registraba para los respectivos cálculos. Seguidamente, a este tubo se adicionaban 10 mL de ácido clorhídrico al 10%. La mezcla se homogenizaba con agitador horizontal y luego era centrifugada. Así la muestra era dejada en reposo durante al menos 12 horas. Pasado este tiempo, la muestra era nuevamente centrifugada y filtrada con papel filtro no silanizado. El filtrado era entonces medido en el espectrofotómetro.

Naturalmente, los problemas suscitados radicaban especialmente en la precisión de las mediciones. En cuanto a la recuperación, y por ende la veracidad, las fuentes de contaminación en el proceso fueron notables.

El contenido gástrico es un tipo de matriz heterogéneo y complejo. El procedimiento originalmente diseñado consiste en interpolar la absorbancia de la muestra con una curva de calibración elaborada en solución acuosa de ácido clorhídrico, sin tomar en consideración el efecto de la matriz sobre la medición del analito. La pobre repetibilidad obtenida en muchas ocasiones sugiere que la heterogeneidad de la matriz y sus características poco estudiadas influyen de alguna manera interfiriendo en la medición. También se observaron lecturas de absorbancia excesivamente altas por efecto del humo dentro del horno de grafito y mediciones defectuosas por adhesión de material graso en la sonda del muestreador.



Por tanto, se plantea el diseño de un procedimiento de pretratamiento, con el objetivo de obtener resultados reproducibles y recuperaciones admisibles.

### d) Método y modelo de calibración

Los problemas antes expuestos llevan a evaluar el efecto de la matriz y en caso de ser necesario cambiar el modo de calibración a adición de estándar, como es casi de obligatorio cuando se trabaja con matrices biológicas. Él método de calibración y el modelo matemático se valoran en función de la exactitud de los resultados que pueden obtenerse por los mismos.

Este estudio proyecta entonces rediseñar el método analítico para la determinación de aluminio en contenido gástrico y validarlo como un método alternativo para la confirmación de intoxicaciones por ingestión de fosfuro de aluminio. Como requisitos adicionales se plantea un procedimiento eficiente, rápido y de fácil aplicación.



# **1. OBJETIVOS**

## **1.1.** Objetivo general

Desarrollar y validar un método rutinario para la determinación de aluminio elemental en muestras de contenido gástrico por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, con el fin de ser aplicado para la confirmación de intoxicaciones por ingesta de fosfuro de aluminio

## **1.2.** Objetivos específicos

- **1.2.1.** Identificar los factores que afectan la linealidad, la recuperación y la reproducibilidad del sistema analítico para la determinación de aluminio en contenido gástrico
- **1.2.2.** Optimizar el procedimiento analítico para la determinación de aluminio en contenido gástrico, partiendo de los factores identificados
- **1.2.3.** Determinar un límite de decisión que discrimine eficazmente las muestras de individuos intoxicados por ingestión de fosfuro de aluminio de las provenientes de casos relacionados a otras causas de muerte
- **1.2.4.** Validar la adecuación del método a su propósito, verificando el cumplimiento de los siguientes parámetros de desempeño: selectividad, modelo de calibración (linealidad), recuperación, veracidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), estabilidad, límite de detección y límite de cuantificación.



# 2. REVISIÓN DOCUMENTAL

## 2.1. Toxicología

### 2.1.1. Epidemiología

El fosfuro de aluminio es un producto altamente eficaz para el control de ciertas plagas. Pero a partir de la década de la década de los 90 se incrementó dramáticamente el número de envenenamientos por ingestión intencional de este agroquímico en varios países del mundo, inclusive en Francia, Turquía y Alemania<sup>5</sup>. En la India, el uso indebido cobró un auge representativo.

En la India se han reconocido los envenenamientos con pesticidas como un problema significativo. En partes del norte, el fosfuro de aluminio es el principal agente letal en las muertes de una epidemia que comenzó 20 años atrás. Un estudio retrospectivo de 25 años de autopsias (5933 muertes no naturales), en un hospital del noroeste de la India, reveló que desde del período comprendido entre 1987 y 1997 el fosfuro de aluminio fue uno de los principales causantes de las muertes por intoxicación, con una incidencia del 26,5% de los casos, que incrementó a un 80% a partir de 1992<sup>7</sup>. Mientras que en el sur de la India, en un hospital en Mangalore, de los casos admitidos en el departamento de emergencias entre enero del 2001 a mayo del 2003, el fosfuro de aluminio resultó ser el causante del 15% de las muertes. El estudio señala que el fosfuro de aluminio amerita una alta prioridad en el cuidado de la salud en el sur de la India<sup>3</sup>.

En Irán, el Centro de Medicina Legal en Tehran, reporta que de 3885 autopsias referidas al laboratorio de toxicología forense, en el período comprendido entre el 2003 y 2004, 51 correspondieron a muertes por intoxicación con pesticidas. El 35,3% de los casos correspondieron a muertes por fosfuro de aluminio, posicionándolo como la causa más importante de envenenamiento<sup>2</sup>.

En Marruecos, al menos 27 casos fueron admitidos a la unidad de cuidados intensivos, entre enero de 1992 y diciembre del 2002, por intoxicaciones agudas con fosfuro de aluminio en el Hospital Avicenne, en la ciudad de Rabat, con un 61% de mortalidad. En un estudio retrospectivo realizado en este centro se encontró que la dosis promedio ingerida fue de 3,3 ± 1,8 g<sup>4</sup>, equivalente a 1 ± 0,5 tabletas de fosfuro de aluminio en formulación comercial.

En Centro América el fosfuro de aluminio se encuentra entre los 12 pesticidas más frecuentemente reportados como causantes de intoxicaciones agudas<sup>8</sup>. Los datos epidemiológicos encontrados son aún más alarmantes.

En el período comprendido entre 1995 y 2004, el centro nacional de toxicología de Nicaragua, registró un total de 1872 casos de intoxicaciones agudas por fosfuro de aluminio. El número de intoxicaciones agudas acrecentó un 800% en 4 años, concomitante al aumento del uso del fosfuro de aluminio en intentos de suicidio. No obstante la mortalidad ha disminuido de un 65% (1997) a



un 40% (2004) debido a una mejora en la atención médica. Se estima una dosis media entre 2 y 6 gramos de fosfuro de aluminio en formulación comercial<sup>1</sup> (aproximadamente de 0,5 a 3 tabletas)

En Honduras, desde 1999 hasta el 2004, se registraron en la morgue del Ministerio Público 15980 autopsias, de las cuales 596 corresponden a muertes suicidas, constituyendo la tercera causa más frecuente de muertes no naturales. Debido a la fácil adquisición y escaso control gubernamental, el fosfuro de aluminio es particularmente asequible y representa desde un 14% (2001) al 23% (2004) de los medios utilizados en el primer quinquenio de la presente década<sup>6</sup>. Para el primer trimestre del año 2006 se reportaron a nivel nacional 66 casos de suicidio, y en el 2007 se registraron 62 casos en ese mismo período. En este último año, el mecanismo más utilizado para fines suicidas fue el envenenamiento (21 casos), especialmente con productos agro veterinarios (34%), lo que significa que la incidencia ha incrementado desde inicios de la década del 2000. El principal tóxico utilizado de estos productos agro veterinarios es el fosfuro de aluminio<sup>9</sup>.

En base a estos estudios, podría inferirse que el factor en común en países en vías de desarrollo es la fácil adquisición e insuficiente control de este plaguicida. La investigación de fosfuro de aluminio queda por tanto como tarea para las sociedades emergentes.

### 2.1.2. Causas de intoxicación y vías de administración

Desde un punto de vista forense, la muerte por fosfuro de aluminio puede ser de causa suicida, accidental u homicida. Según los datos publicados, esta última no ha sido significativa, quizás por las características fácilmente perceptibles del veneno. El fosfuro de aluminio en formulación comercial posee un olor penetrante y repulsivo, lo suficiente como para alertar a la víctima de su presencia, aunque su utilización como medio homicida no debe descartarse; de hecho, en Honduras, en marzo de 2008 se presentó un caso donde la víctima fue obligada a ingerir varias tabletas de fosfuro de aluminio.

Las muertes accidentales son de mayor importancia en el campo laboral. En Nicaragua se ha reportado una alta incidencia de intoxicaciones agudas por plaguicidas, con tasas promedio superiores a los 50 casos por 100 000 habitantes, principalmente debido a metamidofós, paraquat y fosfuro de aluminio. La tasa de letalidad por intoxicación con fosfuro de aluminio llega a ser de un 14% a nivel mundial<sup>10</sup>. La principal forma de intoxicación es por exposición del gas liberado, fosfina, ante un uso inadecuado del producto o al laborar en un medio saturado sin la debida protección. También se han reportado casos de muerte por aplicación vaginal, principalmente en mujeres de bajos niveles educativos, que con intenciones de aborto introducen el veneno en la vagina. Ante la humedad de la misma, se libera la fosfina causando el efecto letal.

Para la toxicología forense, la causa que ha provocado mayor interés es del tipo suicida. En la sección **2.1.1** se expuso sintéticamente sobre la extensión del uso del fosfuro de aluminio en perjuicio intencional de la vida propia y los motivos por los que se ha posicionado entre los principales medios utilizados. La vía de administración más recurrente en estos casos es la vía oral.



Existe una relación importante entre la vía de administración y la causa o motivo de la intoxicación. La forma de administración más relevante en los casos de muertes suicidas es la vía oral, y la más usual en intoxicaciones laborales es la respiratoria.

Para la investigación forense, el estudio se focaliza entonces en la intoxicación de tipo suicida por vía oral.

### 2.1.3. Toxicodinamia

La principal vía de absorción de la fosfina es la pulmonar. Cuando el fosfuro de aluminio es ingerido, reacciona con el agua y el ácido clorhídrico del jugo gástrico, liberando violentamente altas concentraciones de fosfina. El gas se difunde rápidamente hacia los pulmones, desplazando al oxígeno y ejerciendo mayor presión; allí es donde ocurre la absorción más relevante y el comportamiento de la molécula es similar al cianuro o al monóxido de carbono. Parte de la fosfina generada se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal pasando a la circulación sanguínea. Esta absorción es comprobada con la presencia del gas en el hígado. Simultáneamente, ingresa al sistema circulatorio a través del epitelio pulmonar<sup>11</sup>.

Los productos secundarios de la hidrólisis ácida quedan en el estómago con una absorción relativamente baja. Entre los subproductos mayoritarios se encuentran el aluminio, que a su vez forma varias especies químicas en dependencia del pH del medio y la presencia de algunos iones orgánicos e inorgánicos. Aunque la biodisponibilidad del aluminio es sumamente baja, ante las altas concentraciones en el medio, podrían ocurrir procesos de absorción al torrente sanguíneo; asimismo, es posible que sucedan procesos de transporte a lo largo del tracto digestivo. De cualquier manera, los hidróxidos y sales de aluminio seguramente quedaran dentro del organismo por más tiempo que la fosfina, o incluso pueden permanecer como rastro del envenenamiento después de la muerte.

La fosfina, una vez que ha pasado al torrente sanguíneo, puede causar la desnaturalización de la oxihemoglobina, haciendo uso también del grupo hemo para transportarse y difundirse a las células del cuerpo. También tiende a acumularse a nivel de endotelio principalmente en los neumocitos, hígado, sistema cardiovascular y renal. Incluso, se ha demostrado en animales de experimentación que la fosfina hidrolizada puede detectarse en el sistema nervioso central.

Los mecanismos de toxicidad no se entienden del todo bien. Se ha sugerido que se trata de un tóxico de amplio espectro, por la participación de varios órganos en la toxicidad<sup>12</sup>. Por ejemplo, se han encontrado niveles extra celulares de magnesio ligeramente elevados, lo que sugiere una pérdida del magnesio intracelular y daño al miocárdico; simultáneamente, se manifiesta daño hepático y edema pulmonar, entre otros hallazgos.

En el corazón, la fosfina provoca pericarditis y miocarditis, pudiendo fustigar con sangrado a nivel miocárdico; junto con la vasoplejía generalizada esto conlleva al shock cardiogénico.

La fosfina que satura los pulmones desplaza al oxígeno y tiende a unirse a las membranas de los neumocitos, donde desencadena la formación de radicales libres y segundos mensajeros de origen



lipídico. Esta unión a los mastocitos provoca disminución del surfactante, por consecuencia la permeabilidad de la membrana alvéolo capilar. El daño pulmonar directo de la fosfina, junto con otros factores concomitantes, precipitan la formación del edema agudo de pulmón.

A nivel renal la fosfina provoca vasoplejía y con el bajo gasto cardíaco desencadenan la formación de insuficiencia renal aguda, además del daño del endotelio capilar renal, que empeora el pronóstico del paciente.

Se ha descrito un mecanismo en el que la fosfina se une a los endotelios en general, estimulando la formación de radicales libres, probablemente a través de la estimulación de la fosfolipasa, con la degradación de los lípidos de la membrana celular. Esta formación de radicales libres provoca alteración de la permeabilidad de la membrana, con la introducción de calcio al interior de la célula.

Actualmente se han realizado estudios que dilucidan un poco más la toxicodinamia de la fosfina. Se ha comprobado que la fosfina reduce considerablemente la eficiencia catalítica de la citocromo oxidasa C y afecta la actividad de la succinil deshidrogenada y la NADH-deshidrogenasa. La inhibición de la citocromo oxidasa por la fosfina trae como consecuencia la liberación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que combinado con una disminución de la actividad de la peroxidasa y la catalasa podría resultar en la acumulación de  $H_2O_2$  y de la formación de radicales hidroxilos. El ataque de estos radicales altamente reactivos podría dar lugar a modificaciones químicas de las proteínas, lípidos, carbohidratos y nucleótidos, que darían lugar a graves daños metabólicos y celulares. También se ha informado de que la fosfina posee un efecto inhibidor de la respiración aeróbica de manera similar a la del cianuro.<sup>13</sup>

Las fuentes hasta ahora consultadas señalan que el mecanismo de la fosfina consiste fundamentalmente en una reacción de óxido reducción. La fosfina es un reductor que reacciona con metales pesados como el hierro en la hemoglobina y los metales de las metaloenzimas en las células. La acción reductora de la fosfina ( $E_o$  para su conversión a hipofosfito = -1,18 V) sobre diversos sistemas redox en la cadena respiratoria, principalmente en el citocromo C ( $E_o$  +0,25 V) y citocromo C oxidasa, se deben a su mayor potencial redox ( $E_o$  +0,29 V). Se ha encontrado una disminución en la actividad de la citocromo oxidasa, la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones, que correlaciona bien con la disminución de la tasa de respiración.<sup>13</sup>

El fosfuro de aluminio ejerce entonces sus efectos tóxicos principalmente por alteración del transporte de electrones, causando menoscabo en la producción energética de la célula. Este bloqueo se centra en las mitocondrias, las cuales juegan un papel central en el metabolismo celular de energía, suministrando más del 90% del total de ATP requerido por las células eucarióticas. El agotamiento de los niveles de ATP, como consecuencia de la inhibición de la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones, a su vez, puede alterar las diversas funciones subsecuentes, tales como elevaciones de los niveles de calcio citosólico libre y de la peroxidación lipídica, que conducen a una serie de efectos secundarios de la intoxicación por fosfuro de aluminio. El fosfuro de aluminio puede conducir a la disfunción energética mitocondrial y desencadenar una cascada de efectos moleculares secundarios<sup>13</sup>.



Al final, la fosfina inalterada sale del cuerpo casi por completo. El 90% del tóxico absorbido se elimina por la vía respiratoria. Se constata claramente que es una de las principales vías de eliminación cuando se percibe el olor característico a ajo o pescado podrido en el aliento de las víctimas que se debe a fosfinas organosustituidas. La eliminación puede mantenerse hasta 3 a 5 días posterior a la intoxicación. El 10% aproximadamente puede eliminarse a nivel renal y digestivo. Debido a su alta volatilidad e hidrofobicidad, la fosfina es inestable en los fluidos acuosos, manteniéndose en los mismos por muy poco tiempo, al menos que se tomen las precauciones pertinentes para su preservación cuando son recolectados.

# 2.2. Metodologías de análisis para la confirmación de intoxicaciones por fosfuro de aluminio

### 2.2.1. Cromatografía de gases con detección termoiónica (NPD)

Existen técnicas electivas para el estudio toxicológico del fosfuro de aluminio, la cromatografía de gases con detección termoiónica de fósforo-nitrógeno (CG-NPD) es sin duda la más recomendada. Esta técnica se basa en la detección de la fosfina no biotransformada, generalmente en un sistema *headspace*, donde la muestra no requiere mayores procesos de pretratamiento.

La CG-NPD puede presentar falsos negativos cuando los especímenes no han sido adecuadamente manipulados. El riesgo radica en la volatilidad e inestabilidad del analito, aún con los más rigurosos cuidados es posible no detectar la fosfina en algunos especímenes. Esto es un problema no sólo del sistema NPD sino también de otros métodos de ensayo como la cromatografía acoplada a espectrometría de masas<sup>14</sup>. Por otra parte, un resultado positivo tiene las limitaciones propias de la cromatografía gaseosa, y se debe asegurar la selectividad del método. Las muestras biológicas poseen características impredecibles y siempre conllevan un margen de riesgo, un interferente volátil presente en la muestra por ejemplo puede tener un tiempo de retención muy similar y generar una falsa señal.

La manipulación preanalítica es sumamente crítica cuando se decide identificar directamente la fosfina. El procedimiento requiere un entrenamiento adecuado al personal responsable de la recolección de especímenes en las salas de autopsias. Las pérdidas pueden producirse entre el tiempo de la muerte y la autopsia, asimismo entre esta y el ensayo, aún en las mejores condiciones de almacenamiento. Particularmente, para el método de detección por CG-NPD en sistema headspace, se ha recomendado trasvasar la muestra, durante la realización de la autopsia, directamente del cuerpo al vial del automuestreador respectivo, sellando el mismo inmediatamente y almacenando a temperatura de congelación<sup>14</sup>. En toxicología clínica, un ensayo por cromatografía de gases podría ser más que suficiente, pero para efectos de la toxicología forense seria siempre prudente realizar una segunda prueba con otra metodología para confirmar dichos resultados, en especial cuando el informe se somete a juicio como medio de prueba.



El Laboratorio Químico Toxicológico de Honduras no cuenta actualmente con un cromatógrafo de gases habilitado con un detector termoiónico, por lo que esta metodología escapa de sus capacidades instaladas.

### 2.2.2. Ensayos químicos

La técnica más común es el ensayo de color. Las pruebas químicas son relativamente baratas pero también complicadas y poco selectivas. El método recomendado en el *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* (versión electrónica 2006) consiste en transvasar 5 mL de muestra (sangre, orina, contenido gástrico o residuos encontrados en la escena del crimen) en un tubo de ebullición, sellar con un corcho, el cual tiene dos hendiduras e insertar en una un cinto de papel filtro preparado con solución saturada de nitrato de plata, y en la otra un cinto de papel filtro preparado con una solución de acetato de plomo (100 g/L), luego sellar y calentar en baño de agua a 60 °C por 20 minutos. Si únicamente el papel con nitrato de plata se oscurece, se indica presuntamente la presencia de fosfuros o fósforo volátil en la muestra; en cambio, si ambas tiras de papel ennegrecen, puede ser debido a la presencia de gases sulfurosos. Posteriormente se recomienda como test confirmatorio un tratamiento químico al cinto de papel filtro con nitrato de plata que ha oscurecido, tratando con hipoclorito de calcio por 15 minutos y lavando cuidadosamente el exceso de oxidante, adicionando seguidamente molibdato de amonio en solución nítrica y secando la tira de papel para posteriormente agregar orto-toluidina en solución acética y por último exponiéndola a vapores amoniacales. La aparición de un color azul confirmaría la presencia de fósforo<sup>5</sup>.

Otra prueba de color consiste en introducir una muestra biológica (25 g) a un matraz cónico, que a su vez contiene un tubo con algodón saturado de acetato de plomo, se adiciona ácido sulfúrico diluido y se cierra con papel filtro saturado con nitrato de plata, luego se calienta en baño de agua entre 40 °C y 60 °C. Si el papel ha oscurecido, es secado y cortado en pequeños trozos para ser disueltos en ácido nítrico diluido. El extracto se evapora a sequedad, nuevamente se repite la operación con 2 o 3 alícuotas más de ácido nítrico diluido. Los residuos se recogen en unas cuantas gotas de ácido nítrico concentrado, se adiciona 1 mL de solución de molibdato de amonio y se calienta (sin exceso). Se indica la presencia de la fosfina por la aparición de un color amarillo brillante (*"amarillo canario"*)<sup>15</sup>

Las pruebas de coloración denotan algunas limitaciones. Los ensayos no son específicos para el fosfuro de aluminio o la fosfina; por otra parte, se requiere una cantidad gravosa de muestra para asegurar la detección, a la vez que no se garantiza una recuperación adecuada del analito. Como se ha expuesto anteriormente, algunos especímenes pueden contener cantidades tan pequeñas de fosfina que no es posible su detección, inclusive por métodos instrumentales. Por tanto, existe un margen de error considerable en los ensayos de color, tanto de falsos negativos como falsos positivos. De hecho, en la validación de un test para fosfina en tejidos humanos, realizado por Raina y col. (India), se observó que el 65% de tejidos humanos, en soluciones saturadas de sales comunes, mostraron falsos positivos para fosfina en el primer día de la autopsia; del mismo modo, muchos casos han sido reportados positivos para fosfuro de aluminio, aún cuando no existen hallazgos clínicos o postmortem ni evidencia alguna de tales circunstancias<sup>16</sup>.



Los requerimientos preanalíticos para las muestras destinadas a pruebas de color, son comparables a los indicados para el análisis por cromatografía de gases. En la experiencia del Laboratorio Químico Toxicológico, la prueba de coloración tiene un bajo rendimiento y poca reproducibilidad en los reanálisis<sup>a</sup> y los estudios posteriores quedan limitados.

### 2.2.3. Determinación de aluminio por espectrofotometría de absorción atómica

Las determinaciones directas de fosfina en muestras biológicas se dificultan por la reactividad y volatilidad de la molécula. Los fosfuros metálicos son más fácilmente determinados por los cationes producidos luego de las reacciones de hidrólisis. Comúnmente los cationes de sales tóxicas inorgánicas sirven como evidencia del envenenamiento, en especial cuando normalmente estos no son abundantes en el organismo.

Se ha propuesto anteriormente como alternativa una valoración indirecta por medición de un producto secundario de la reacción del fosfuro de aluminio. Este producto secundario es el aluminio, que dependiendo de las condiciones del medio, queda en forma de hidróxido, sal binaria o alguna otra especie química en el tracto digestivo.

Las principales reacciones que suceden al momento de la ingestión de fosfuro de aluminio se exponen en la sección **2.1.2** y se detallan en la sección **2.5**. Al reaccionar el fosfuro de aluminio con el ácido clorhídrico del jugo gástrico produciría varias especies químicas, entre ellas el cloruro de aluminio, las cuales son más estables en el medio que la fosfina liberada. De ello se formula como hipótesis que el aluminio total puede ser utilizado como un indicador estable y abundante para el estudio forense de las intoxicaciones por ingesta de fosfuro de aluminio.

La matriz de primera elección es el contenido gástrico, por ser el estómago propiamente el receptáculo donde ocurren las reacciones del fosfuro de aluminio cuando es ingerido.

Se ha probado una correspondencia entre la concentración de aluminio en contenido gástrico y la intoxicación aguda por ingestión de fosfuro de aluminio. En el año 2003, se realizó un estudio con 160 muestras de contenido gástrico. Los niveles de aluminio en muestras diluidas de individuos cuya causa de muerte fue natural, por arma de fuego, arma blanca o hechos de tránsito, fueron iguales o menores a 749 µg/L; en tanto que los valores en individuos que ingirieron fosfuro de aluminio resultaron ser de 2127 µg/L a 3646 µg/L, inclusive ser encontró un valor atípico de 109200 µg/L (109,2 mg/L). Las diferencias entre ambos grupos fueron significativas, de manera que se demostró factibilidad para establecer la concentración de aluminio en contenido gástrico como indicador de las intoxicaciones con fosfuro de aluminio por vía oral<sup>6</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> En ocasiones, una de las partes de un debate legal solicita la repetición de una pericia. Cuando el juez lo autoriza y es técnicamente posible, se procede a repetir el ensayo. Idealmente, todo material biológico debería ser apto para el reanálisis en un período prudencial de tiempo.



# 2.3. Metodologías espectrofotométricas de absorción atómica para la determinación de aluminio en especímenes biológicos

Existe un número pródigo de técnicas que pueden ser aplicadas a la medición de aluminio. En toxicología, pueden ser empleados métodos gravimétricos y colorimétricos para la cuantificación de aluminio; sin embargo resultan complicadas y riesgosas, envolviendo una serie de pasos que acarrean posibles errores en la medición. La Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito es una técnica altamente específica y sensible, que resulta adecuada para determinaciones rápidas y fiables, especialmente en matrices tan complejas como los materiales biológicos; de hecho, es la técnica electiva para las determinaciones de aluminio sérico, en sangre total y en general en especímenes biológicos<sup>17</sup>.

La Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR por sus siglas en inglés) ha identificado un grupo de métodos utilizados como métodos estándar<sup>18</sup>. Muchos de estos métodos analíticos son aprobados por las agencias federales de los Estados Unidos, tales como la EPA, el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), asimismo por organizaciones como la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) y la Asociación Americana de Salud Pública (APHA). Algunos de los métodos recopilados por la ATSDR son modificaciones de otros y fueron mejorados con el fin obtener límites de detección más bajos, optimizar la veracidad y la precisión de las mediciones. La ATSDR únicamente hace referencia de estos métodos como guía, por tanto no se detallan sus procedimientos y condiciones de operación. La ATSDR sugiere que la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito es la técnica electiva para la cuantificación de aluminio en materiales biológicos, que utilizan como técnica la espectrofotometría de absorción atómica (EAAHG):

······································					
Matriz	Método de preparación	Límite de detección en la muestra	Porcentaje de recuperación	Referencia del método	
Suero Inyección directa		Bajos niveles (µg/dm <sup>3</sup> )	Sin datos	King et al. (1981)	
Suero	Dilución con agua y adición de EDTA	2 μg/dm³	Sin datos	Alderman y Gitelman (1980)	
Suero	Centrifugación e inyección del sobrenadante	14,3 µg/dm <sup>3</sup>	97% - 102%	Bettinelli et al. (1980)	
Suero (especies de aluminio con ácidos orgánicos)	Adición de bicarbonato de sodio; inyección directa en columna cromatográfica; dilución con fase móvil (HPLC/EAAHG)	Sin datos	98% - 100% (en muestras fortificadas y suero sintético)	Wrobel et al. (1995)	
Suero (especies de aluminio con ácidos orgánicos)	Adición de buffer de citratos; inyección directa en columna cromatográfica (HPLC/EAAHG)	0,12 μg/dm <sup>3</sup>	(99,2 ± 12,4 )%	Van Landeghem et al. (1994)	
Plasma	Dilución	(3 – 39)µg/dm <sup>3</sup>	97% - 105%	Wawschinek et al. (1982)	

Tabla 1 Métodos analíticos para determinar aluminio en materiales biológicos



Matriz Método de preparación		Límite de detección en la muestra	Porcentaje de recuperación	Referencia del método	
Sangre total, plasma o suero	Dilución en agua	24 μg/dm³	Sin datos	Gardiner et al. (1981)	
Sangre total	Adición de citrato sódico; centrifugación; inyección de sobrenadante	Bajos niveles (μg/dm³)	Sin datos	Gorsky y Dietz (1978)	
Sangre total	Dilución con Tritón X-100	1,9 μg/dm <sup>3</sup> (suero) 1,8 μg/dm <sup>3</sup> (plasma) 2,3 μg/dm <sup>3</sup> (sangre total)	Sin datos	Van der Voet et al. (1985)	
Suero y orina	Dilución con ácido nítrico 0,2% y agua	0,6 μg/dm <sup>3</sup> (suero y orina)	Sin datos	Razniewska y Trzcinka-Ochocka (2003)	
Tejidos biológicos	Homogenización con EDTA	(0,002 – 10,057) μg/g	95% - 106%	LeGendre y Alfrey (1976)	
Tejidos biológicos	Secado; digestión ácida con ácido nítrico; dilución con agua	0,5 µg/g	80% - 117%	Bouman et al. (1986)	

Se han divulgado métodos independientes más detallados para la determinación de aluminio en sangre. Gitelman y Alderman publicaron en 1989 un método en el que se utiliza hidróxido de amonio y ácido sulfúrico como diluyente para el control de los efectos de matriz de los constituyentes del suero. No fue encontrada evidencia de efectos de matriz por esta metodología y pudo efectuarse una calibración directa con patrones acuosos. Para la realización de estas determinaciones, fue utilizado un espectrofotómetro con horno de grafito con recubrimiento pirolítico, plataforma de grafito y efecto Zeeman. El rango de trabajo fue de 100  $\mu$ g Al/L – 600  $\mu$ g Al/L con un comportamiento gráfico curvilíneo de la relación concentración-respuesta, por lo que las aproximaciones se realizaron con un modelo de calibración de dos coeficientes. El diluyente fue preparado a base de una mezcla de 8,35 mL de solución de hidróxido de amonio 200 mL/L (calidad ultrapuro), 1,0 mL de ácido sulfúrico (grado ultrapuro), 5,0 mmol de EDTA disódico, y 1,5 mL de Tritón X-100 como surfactante. La muestra fue preparada adicionando 200  $\mu$ L de la misma a 800  $\mu$ L de diluyente, y seguidamente homogenizada. Los resultados fueron considerados reproducibles y la sensitividad obtenida fue de 12 pg. Este diluyente fue diseñado con el objetivo de remover la interferencia producida por los iones cloruro en el proceso de calentamiento del horno de grafito. El valor sérico promedio encontrado con este método, en un grupo de 10 individuos sanos, fue (3,1 ± 1,1) μg/L.<sup>19</sup>

Durante la investigación bibliográfica el método desarrollado en el Laboratorio Químico Toxicológico es el único encontrado hasta el momento para la cuantificación de aluminio en contenido gástrico.



# **2.4.** Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito<sup>20,21</sup>

Para el desarrollo de un método de cuantificación del aluminio por Espectrofotometría de Absorción Atómica deber ser tomado en consideración aspectos particulares del analito en el sistema de un horno de grafito, el funcionamiento de la técnica en sí y las características de las matrices de trabajo. En esta sección se atiende especialmente el conocimiento de la técnica y su instrumentación. La comprensión de la técnica permitirá a su vez poder dilucidar factores fuertemente influyentes en los resultados, la modelización del comportamiento físico químico del analito y la optimización sistemática de estos aspectos.

### 2.4.1. Fundamento teórico

La espectroscopia se define como la interacción de radiación electromagnética (luz) con la materia. La radiación electromagnética se describe tanto por sus propiedades de partícula como de onda. Las propiedades de onda incluyen a la frecuencia, longitud de onda, velocidad y amplitud. Se considera también que la luz está compuesta por partículas llamadas fotones que tienen una energía característica. La relación entre esa energía con la frecuencia y longitud de onda se define por la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$E = hv = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde *E* es la energía de la unidad fotónica medida en joules (J), *c* es la velocidad de la luz en el vacío (2,9972x10<sup>8</sup> m/s), *h* es la constante de Planck (6,62608x10<sup>-34</sup> J·s), *v* es la frecuencia medida en Hertz y  $\lambda$  es la longitud de onda medida en metros.

El espectro electromagnético cubre un rango de longitudes de onda por encima de catorce órdenes de magnitud, incluyendo regiones de rayos gamma, rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microonda y radiofrecuencia. Para la espectrometría de absorción atómica las regiones de mayor interés se limitan entre 180 nm y 900 nm que corresponden a la luz ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. Entre estas longitudes de onda se verifican las transiciones de los electrones de valencia.

La espectroscopia atómica envuelve la interacción de la luz con átomos gaseosos a través de un dispositivo denominado *"celda de atomización"*. Entre las celdas de atomización se incluyen fuentes de llama, plasma y hornos de grafito. Existen tres tipos básicos de espectroscopia atómica: emisión atómica, absorción atómica y fluorescencia atómica.

El fenómeno de la absorción atómica puede ser explicado por el modelo de un átomo cuyos electrones pueden tener dos estados de energía: uno fundamental, estable, de baja energía designado como estado 0 y otro excitado, inestable de alta energía designado como estado 1. El modelo del átomo es clásicamente representado por un núcleo conformado por positrones y neutrones, rodeado por electrones girando en órbitas específicas. Cada elemento de la tabla periódica tiene un número específico de electrones asociado con el número de partículas



subatómicas nucleares. Cada electrón se ubica en una posición específica, conformando una configuración que representa el menor presupuesto energético para sustentar la integridad estructural del átomo, este ordenamiento se conoce como estado basal o fundamental. Se asume generalmente que bajo condiciones normales la mayoría de los átomos se encuentran en su estado fundamental. En la medida que un electrón se encuentra en su órbita definida no es emitida ninguna energía electromagnética, pero cuando ocurre un cambio en alguna órbita el reordenamiento busca otro nivel de energía y el exceso de energía es emitida en forma de radiación electromagnética. En la absorción atómica ocurre una transferencia de energía de un fotón a un átomo para promover un electrón de valencia del estado fundamental (0) a otro excitado (1). Para que la absorción ocurra, la energía del fotón debe ser idéntica a la diferencia en la energía entre el nivel bajo (0) y el nivel alto (1).

Ilustración 1. Representación esquemática de absorción de energía en un átomo metálico gaseoso (M<sub>(g)</sub>) para promover un electrón del estado 0 (M<sup>0</sup><sub>(g)</sub>) al estado excitado 1 (M\*<sub>(g)</sub>)



Como las demás espectroscopias, es posible obtener un espectro del fenómeno de absorción atómica. En un espectro se representan todas las posibles interacciones de la materia con un rango predeterminado de energía electromagnética. Los espectros moleculares consisten en una integración de transiciones atómicas e interatómicas, caracterizándose por gráficos anchos que tienden a una distribución Lorentziana; en cambio, los espectros atómicos se caracterizan por su relativa simplicidad, típicamente consistiendo en líneas cercanas, las cuales corresponden a un limitado número de posibles transiciones de niveles energéticos intraatómicos. Cada elemento tiene un conjunto de niveles energéticos (configuración electrónica) y por tanto un espectro único. A las temperaturas que alcanzan las celdas de atomización utilizadas para absorción atómica (1500 °C – 3000 °C), la mayoría de los átomos se encuentra en estado fundamental y consecuentemente las líneas más sensitivas implican transiciones de este estado, estas líneas se llaman transiciones de resonancia. El ancho natural de las bandas más grandes de un espectro atómico son típicamente de 0,01 nm a 0,05 nm, un rango mucho más estrecho que las bandas moleculares en fase líquida, las cuales son típicamente de 10 nm a 100 nm. La ausencia de niveles rotacionales y vibracionales en los átomos producen anchos más reducidos en las líneas atómicas.





Ilustración 2. Espectro molecular en región visible (hemoglobina reducida)

Esta característica espectroscópica de los átomos permite utilizar longitudes de onda más específicas para cada elemento. Así puede obtenerse un espectro en el orden de décimas de nanómetro de un elemento sin la interferencia de otro presente en la misma muestra, debido a que ambos elementos absorberán energías diferentes. Los traslapes de espectros de distintos elementos son relativamente inusuales en espectroscopia atómica.

Para determinar cuantitativamente un elemento por se escoge una longitud de onda apropiada, generalmente donde se obtienen las líneas más intensas, con un estrecho margen de décimas de nanómetro. Idealmente, un haz de luz monocromática de intensidad  $I^0$  traspasa la celda de atomización, donde se encuentra el analito en estado gaseoso. Una cantidad de la energía es absorbida por la población atómica afín a la misma por unas décimas de segundo, en ese instante el haz sale de la celda, con una intensidad I, hacia un sistema de detección que convierte el haz de luz a una señal eléctrica. La cantidad de energía absorbida por los átomos es directamente proporcional a la población de los mismos en estado fundamental. La relación de intensidad del haz saliente con la del haz entrante a la celda se define como transmitancia (T) y se describe con la siguiente ecuación:



### Ecuación 2

$$T = \frac{I}{I_0}$$

T

Esta ecuación representa la fracción de luz transmitida a través de la celda. La transmitancia puede tener un valor desde 0, cuando toda la energía ha sido absorbida por el analito, hasta 1, cuando el analito no está presente y la intensidad del haz saliente es igual a la del haz de entrada. Esta relación es inversamente proporcional a la concentración de átomos libres pero no en un modelo lineal de primer orden, de ahí que usualmente las mediciones se realizan más bien como absorbancia, que es el logaritmo de la relación inversa de la transmitancia. La absorbancia (*A*) se define por la ecuación siguiente:

Ecuación 3 
$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I}$$

La absorbancia es un número sin unidades, que típicamente su magnitud oscila entre 0 y 2, con una precisión óptima entre 0,1 y 0,5. La relación entre la absorbancia y la concentración se describe por la ley de Beer-Lambert (**Ecuación 4**)

### $\mathbf{A} = \mathbf{E} \cdot \mathbf{b} \cdot \mathbf{c}$ Ecuación 4

Donde **E** es llamada constante de absortividad y **b** es la distancia que recorre el haz de luz dentro de la celda, en este caso la longitud del horno de grafito. La magnitud de E se determina por las unidades en las que se expresa **b** y **c** (concentración). La absortividad y la concentración están relacionadas al coeficiente de absorción por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{E} = \mathbf{0.434} \cdot \frac{\mathbf{k}}{\mathbf{c}}$$
  
Ecuación 5

# Las celdas de atomización de los espectrofotómetros emplean relativamente grandes volúmenes de luz debido a la proporcionalidad directa entre absorbancia y el paso del haz. Idealmente estas relaciones son lineales, pudiendo ser aproximadas por modelos de regresión simple, sin embargo la espectrofotometría de absorción atómica presenta algunas peculiaridades que deben ser tomadas en cuenta y que explican por qué es casi imposible lograr un gráfico de calibración rectilíneo. El proceso de absorción atómica, a diferencia de la espectrofotometría molecular, es dinámico y consiste en una serie de subprocesos termodinámicos que ocurren en un lapso corto de tiempo. Es necesario considerar algunos aspectos cuantitativos de las transiciones subatómicas:

### a) Población de los átomos en un estado basal y excitado



Para un sistema simple de dos niveles subatómicos (**Ilustración 1**) la proporción de átomos en estado 1 contra los átomos en estado en estado basal 0 está definida por la distribución de Boltzmann:

 $\frac{\mathbf{N}_{1}}{\mathbf{N}_{0}} = \frac{\mathbf{g}_{1}}{\mathbf{g}_{0}} \cdot \mathbf{e}^{-\mathbf{E}/\mathbf{kT}}$ Ecuación 6

Donde N<sub>1</sub> y N<sub>0</sub> son poblaciones de átomos en estado excitados y en estado basal respectivamente; g1 y g0 son pesos estadísticos de estos niveles, los cuales representan un número de estados intermedios que consuman el cada estado; E es la diferencia de energía entre los estados; k es la constante de Boltzmann (1,3805 x 10<sup>-23</sup> J/K) y T es la temperatura absoluta (K) involucrada en los procesos. La máxima Sensitividad se logra cuando el 100% de los átomos están en estado basal; sin embargo, la ecuación indica que esto nunca sucede  $(N_1/N_0 = g_1/g_0 \cdot e^{-E/kT} = 0)$ . Examinando detenidamente la ecuación, el número de átomos en estado basal disminuye con la temperatura y bajas cantidades de energía de transición, como ocurre en longitudes de onda larga. La longitud de onda de resonancia más alta para los átomos más comúnmente determinados es 852,1 nm, que corresponde al cesio. Cuando la temperatura en el sistema es alrededor de 3000 K, N<sub>1</sub>/N<sub>0</sub> se aproxima a 0,007, cuando la temperatura es 2000 K esta razón baja a 4 x 10<sup>-4.</sup> Esto es efectivo en tanto que no haya cambios en la fracción de átomos atomizados. Pueden ocurrir reacciones químicas que dependen de la temperatura y que afectan la población de átomos gaseosos formados (interferencias químicas). La función en sí misma ya advierte una curvatura inevitable que es propia de las características físicas y químicas del sistema. La temperatura programada del horno de grafito induce a una distribución de poblaciones de átomos en diferentes estados en función del tiempo. Cuando varía la concentración del analito varía la energía requerida para mantener una razón constante de poblaciones, sin embargo en la realidad la intensidad del haz de luz de la lámpara se mantiene relativamente constante. La relación entre ambas variables se demuestra en la ecuación que no es lineal.

### b) Coeficientes de Einstein

Un modelo atómico simple con dos niveles de energía permite dilucidar que ocurren tres tipos de transiciones posibles: **1**-la absorción, en la cual un átomo en estado basal (0) es promovido al estado excitado (1) por interacción con el campo de radiación; **2**-la emisión espontánea en la cual el átomo excitado espontáneamente se desactiva; y *3*- la emisión estimulada, en la cual la desactivación del estado excitado es inducida por la radiación electromagnética. Einstein introdujo tres coeficientes de probabilidad: B<sub>01</sub>, A<sub>10</sub> y B1<sub>0</sub>, los cuales son comúnmente llamados "coeficientes de Einstein", para la absorción, la emisión espontánea y la emisión estimulada respectivamente, los cuales se utilizan para evaluar las tasas de transición radiactiva entre estos estados. La razón radiactiva de excitación por unidad de volumen, W<sub>0→1</sub> (cm-3 s-1), depende de sólo de la razón de absorción y está definida por la siguiente ecuación

$$W_{0\to 1} = \mathbf{B}_{01} \rho \mathbf{N}_0$$
  
Ecuación 7



Donde  $\rho$  es la densidad de energía (J/cm<sup>3</sup> Hz) de la radiación electromagnética en la frecuencia de transición.

La razón de desactivación radiactiva depende de las proporciones de emisión espontánea y emisión estimulada:

$$\begin{split} \mathbf{W}_{1\rightarrow0} = \mathbf{A}_{10}\mathbf{N}_1 + \mathbf{B}_{10}\rho\mathbf{N}_1 \\ \text{Ecuación 8} \end{split}$$

Los coeficientes de absorción y emisión estimulada se relacionan por

 $\mathbf{B}_{01}\mathbf{g}_0 = \mathbf{B}_{10}\mathbf{g}_1$ Ecuación 9

En tanto que la absorción y la emisión espontánea siguen esta relación:

$$\bm{A}_{10} = \frac{8\pi \bm{h} \bm{B}_{01} \bm{g}_0}{\bm{g}_1 \lambda_m^2}$$

Ecuación 10

Donde h es la constante de Planck y  $\lambda_m^2$  es la longitud de onda máxima de absorción y se relaciona junto con el coeficiente B<sub>01</sub> por el siguiente modelo para definir la fuerza osciladora ( $f_{01}$ ), la cual es útil para calcular la masa característica teórica de los elementos para la espectrofotometría de absorción atómica.

$$\mathbf{f}_{01} = \frac{2,50 \mathbf{x} 10^{-34} \mathbf{B}_{01}}{\lambda_{m}}$$

Ecuación 11

A su vez esta fuerza osciladora es una de las variables que definen la intensidad de la absorbancia

$$\mathbf{A} = \frac{3,83 \times 10^{-13} \mathbf{f}_{01} \cdot \mathbf{b} \cdot \mathbf{n}_{0} (\mathbf{t})}{\Delta \lambda_{\text{eff}}}$$

Ecuación 12

La intensidad de una transición y la medida de la señal de absorción son dependientes de que el ancho espectral de la fuente sea más pequeño o más ancho que el perfil espectral de los átomos. Para transiciones de los estados 0 y 1 de un átomo, la absorbancia está dada por la **Ecuación 12**, donde  $\Delta \lambda_{\text{eff}}$  es el ancho del perfil de absorción rectangular, el cual tienen la misma área y valor de pico que la fuente de luz y n<sub>0</sub>(t) es la población de átomo en estado 0 en el momento t del tiempo. Puede anticiparse una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, pero



experimentalmente ocurren fenómenos de no linealidad a relativamente altas concentraciones debido a que ninguna fuente emite una luz verdaderamente monocromática. Sumado a ello, los métodos de corrección con background también reducen el rango lineal del gráfico de calibración. La señal en absorción atómica con horno de grafito difiere de otros sistemas debido a que hay una variación temporal de la población de átomos, produciendo una señal

### 2.4.2. Mecanismos de formación de átomos en el horno de grafito

La generación de una señal espectral atómica implica varios procesos físicos y químicos que es necesario conocer para comprender los factores que influyen en el desempeño de un método analítico. De manera general la formación de la población atómica de elementos metálicos pasa por una secuencia de reacciones de descomposición desde el metal disuelto en forma de sal hasta el átomo libre en estado gaseoso



El horno de grafito es un tubo de una longitud entre 3 mm y 6 mm de diámetro. La temperatura dentro del mismo puede ascender hasta unos 2700°C, con una rampa hasta de 1500 °C/segundo. El mecanismo general consiste en un primer paso de evaporación de la solución, generalmente acuosa, los pasos remanentes incluyen procesos químicos y físicos de superficie, tales como interacciones sólido-sólido, nucleación de fase sólida y difusión dentro del grafito. Ocurren también interacciones heterogéneas gas-sólido como adsorción/desorción y reacciones de formación con las paredes internas del horno; además se dan reacciones homogéneas en la fase gaseosa del sistema y procesos por los cuales se ocurren fugas del analito del horno. A continuación se resumen los detalles de estos procesos

### a) Procesos de superficie

En los pasos (1) y (2) [Ecuación 13] ocurren procesos químicos y físicos sobre la superficie del tubo de grafito.se ha elucidado características especiales de las paredes internas del tubo de grafito como la microgranularidad de los tubos policrisitalinos y en presencia de estructuras con recubrimiento pirolítico y plataformas sólidas pirolíticas. Se ha investigado el efecto de agentes corrosivos sobre el sustrato de grafito, así como los modificadores, de los cuales se ha visualizado microgotas incrustadas en las paredes internos del horno. En ocasiones algunos elementos tienden a formar agregados; por ejemplo, en un experimento el cobre se encontró de forma dispersa en bajas concentraciones pero se formaron microgotas en altas concentraciones, en tanto que los agregados de plata se encontraron en todas las concentraciones. Se ha descubierto una migración importante de varios metales dentro del recubrimiento pirolítico del tubo (≥ 3 µm) se ha investigado el efecto del paladio como modificador químico encontrándose que favorece la difusión de algunos elementos volátiles fijándoles en la superficie interna del horno, en el caso del selenio se atribuyó este fenómeno a la formación de un compuesto de paladio-oxígeno-selenio. Es un hecho que el grafito participa activamente en las reacciones químicas de descomposición pirolítica y de síntesis que se dan lugar dentro del sistema, siendo más activas las superficies sin recubrimiento, en las que se han observado al microscopio que poseen estructuras irregulares que



proporcionan mayor superficie de contacto, en contraste a los tubos con recubrimiento pirolítico que se han mostrado más estables.

### b) Interacciones sólido-gas heterogéneas

Un número de estudios ha considerado los procesos de adsorción y desorción en la superficie de grafito. Estos procesos han sido investigados por la ecuación de desorción:

$$k = -v\sigma_s^n e^{-E_a/RT}$$

Ecuación 14

Donde k es una razón constante;  $\sigma_s$  es la superficie de cobertura de grafito por el analito; v es una constante; R es la constante de los gases; T es la temperatura absoluta;  $E_a$  es la energía de activación y n es el orden de liberación (n  $\ge 0$ ). Para n = 0 no hay dependencia sobre la cobertura superficial de grafito, y se asume entonces que no hay interacción entre el analito y el grafito. Cuando n  $\ge 0$ , la razón de desorción depende de la cobertura de la superficie, implicando que existen fuerzas de atracción entre el metal y el grafito.

Pueden ocurrir reacciones heterogéneas entre las moléculas de la fase gaseosa y el grafito dentro de la cámara para producir átomos gaseosos. En el caso del aluminio, los átomos tienden a concentrarse adyacentes a las paredes del tubo, en tanto que en el eje central se concentran mayoritariamente compuestos moleculares de aluminio. Se ha concluido que el mecanismo de atomización del aluminio incluye la siguiente reacción de reducción heterogénea:

$$Al_{x}O_{(g)} + C_{(s)} \rightarrow xAl_{(g)} + CO_{(g)}$$
  
Ecuación 15

Donde x = 1, 2

### c) Procesos químicos en la fase gaseosa

Actualmente se conoce ampliamente sobre la distribución espacial y especiación temporal de los átomos y moléculas que se encuentran en la fase gaseosa dentro del tubo de grafito. Una vez que los compuestos pasan a la fase gaseosa se forman una serie de compuestos intermedios antes de la atomización, algunos de estos son más estables incluso a temperaturas de atomización y provocan disminución del analito disponible para la absorción atómica.

### d) Procesos de pérdida del analito

El principal mecanismo de pérdida del analito del tubo de grafito son la difusión, la expansión térmica y la expulsión causada por la evolución de gas de la matriz. El tiempo promedio de residencia de un analito está dado por:

$$\mathbf{t}_{\mathsf{d}} = \frac{\left(\mathbf{I}_{\mathsf{t}}\right)^2}{8\mathbf{D}_{\mathsf{T}}}$$

Ecuación 16



Donde  $I_t$  es la longitud de tubo de grafito y  $D_t$  es el coeficiente de difusión, calculado en argón a temperatura **T**. Esta expresión no considera la difusión a través del orificio de dosificación, a través del cual una fracción significativa puede perderse. El coeficiente de difusión a cualquier temperatura puede ser calculado de la siguiente relación

$$\boldsymbol{D}_{\mathsf{T}} = \boldsymbol{D}_{\mathsf{273}} \! \left( \frac{\mathsf{T}}{\mathsf{273}} \right)^{\mathsf{n}_{\mathsf{d}}}$$

Ecuación 17

Donde **D**<sub>273</sub> es el coeficiente de difusión a 273 K y n<sub>d</sub> es un factor exponencial entre 1,65 y 1,96

La expansión térmica puede ser cuantificada por el tiempo requerido  $(t_T)$  para remover una fracción del volumen del tubo  $(x_0/x-1)$  por consideraciones de flujo de fluidos

$$\mathbf{t}_{\mathsf{T}} = \frac{\mathbf{T}_{\mathsf{0}}}{\beta} \left( \frac{\mathbf{x}_{\mathsf{0}}}{\mathbf{x}} - \mathbf{1} \right)$$

### Ecuación 18

Donde  $x_0$  es la distancia entre el centro y el final de tubo de grafito, x es una posición sobre el tubo; T<sub>0</sub> es la temperatura en el tiempo T = 0 (antes de la atomización); y  $\beta$  es la rampa de calor

El efecto de grandes cantidades de gas debido a la descomposición por vaporización de una matriz sobre la señal analítica puede ser expresado por el movimiento de vapores a una distancia  $\delta x$  por

$$\partial \mathbf{x} = \frac{\partial QRT}{PA}$$
Ecuación 19

Donde  $\partial Q$  es el número de moles de gas inyectado dentro del tubo; R es la constante de gases ideales; T es la temperatura absoluta; P res la presión (normalmente asumida de 1 atmósfera); y A es el área del horno de grafito.

Se ha verificado que la difusión es el mecanismo más significativo en intervalos de bajas temperaturas de calentamiento y altas temperaturas de atomización, mientras que la expansión térmica contribuye más fuertemente para elementos volátiles con altas temperaturas de calentamiento. La expulsión térmica por la matriz es sólo significativa si mas de 10<sup>-7</sup> moles de gas están involucrados, y si la vaporización de la matriz y el analito son cercanamente coincidentes.

### 2.4.3. Instrumentación

Las principales partes del espectrofotómetro de absorción atómica que son de interés para el químico analista se resumen en:



- a) La fuente de luz, generalmente una lámpara de cátodo hueco
- b) La celda o compartimento de atomización
- c) El sistema de detección de la luz

A continuación se hace un repaso de dos componentes críticos de un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito

### 2.4.3.1. Lámparas de cátodo hueco

La lámpara de cátodo hueco (LCH) se trata generalmente de un cilindro fabricado del mismo elemento para el que será generado el espectro. Este cilindro consiste en un cátodo que junto con un ánodo se encuentran sellados dentro de un tubo de cuarzo u otro material no absorbente de la luz emitida y dentro se encuentra lleno de un gas inerte, generalmente argón o neón. Cuando es activado el sistema, el gas de llenado se ioniza y colisiona contra cátodo, el cual recibe un bombardeo de cationes en la superficie metálica y entonces se desprenden átomos que en una atmósfera altamente cargada son excitados pasando a un estado más energético pero inestable y por consecuencia vuelve a su estado basal. Cuando este ciclo termina se libera un fotón con una frecuencia, longitud de onda y cantidad de energía muy particular de ese elemento. Este fotón sería absorbido específicamente por otro átomo de igual configuración, es decir del mismo elemento del que fue emitido. Es así que las lámparas de cátodo hueco sufren un proceso de desgaste continuo y generalmente los átomos desprendidos del cátodo impactan alguna parte de la pared interna de la lámpara. Esto sucede con mayor velocidad en lámparas de metales más volátiles.

Ocurre también que algunos materiales pueden lentamente generar hidrógeno cuando se calientan. Como la concentración de hidrógeno mezclado en el gas de llenado incrementa, una emisión continua de línea de fondo contamina la pureza de la línea espectral del elemento emitido, resultando en una reducción de la sensitividad de y en una linealidad pobre en la curva de calibración. Actualmente esto se corrige con diseños especiales que absorben este gas espurio. Mientras la lámpara sea operada con la corriente recomendada, entre 5 mA a 25 mA usualmente, estos fenómenos no afectan drásticamente el desempeño de la lámpara.

### 2.4.3.2. El horno electrotérmico (horno de grafito)

El horno de grafito es el corazón del el equipo instrumental y es la pieza en la que ocurren todos los procesos analíticos de interés.

El horno termoeléctrico consiste en un tubo de grafito con una pequeña cavidad, el cual puede contener una cantidad precisa de muestra, de unos miligramos o algunos microlitros, que son transferidos por medio de un inyector. Este dispositivo de carbono, cuyo eje coincide con el eje óptico del espectrofotómetro, se comporta como un resistor óhmico que puede alcanzar los 3000 K por medio del paso de la corriente eléctrica (efecto joule), esto es aproximadamente entre unos 500 V a 1000 V. Tales incrementos de temperaturas pueden ser graduales y programados, y generalmente comprenden cuatro pasos necesarios para evitar pérdidas por proyecciones drásticas de temperaturas. Primeramente, un paso de secado (alrededor de 100°C) para eliminar el solvente,



componentes líquidos y sustancias volátiles; seguidamente, un paso de descomposición/calcinación (alrededor de 400 °C) que destruye principalmente la materia orgánica, posteriormente, la atomización (alrededor de 2000 °C) donde las rampas de temperatura pueden alcanzar el orden de 2000 °C/s, debido a que la muestra podría alcanzar un estado de gas atómico en un lapso de tres o cuatro segundos; por último, procede un paso de pirolisis o limpieza (alrededor de 2300°C) que elimina cualquier impureza residual dentro del horno.

El tubo de grafito es rodeado por dos manguerillas, una contiene un gas inerte, preferiblemente argón, que circula para proteger los elementos de la oxidación, mientras por la otra circula agua para enfriar el sistema del horno. La atomización con horno de grafito produce una densidad de átomos mayor y un tiempo de confinamiento más prolongado que otros sistemas, en comparación con la atomización con llama la sensitividad se incrementa en un factor de 1000.

Con el horno de grafito ocurren en muchas ocasiones atomizaciones incompletas de las muestras, debido a que la matriz puede producir absorbancias interferentes ante las altas temperaturas que se someten. Esto es más notable con las muestras que contienen partículas en suspensión o difíciles de reducir, donde pueden quedar remanentes de iones o moléculas orgánicas, más aún cuando el aumento de temperatura es tan rápido que el oxígeno del medio se agota prematuramente y la combustión resulta incompleta. Este es el caso de las muestras de origen biológico, sobretodo de las que contienen grandes cantidades de grasas, proteínas y carbohidratos de alto punto de fusión. Como resultado, la línea base presenta una absorción constante conocida como "humo" ("*smoke*"). Como no es posible separar el analito de la matriz en estos procesos, se han diseñado dispositivos especiales para resolver el problema de esta absorción no atómica, uno de ellos es el sistema de doble haz.

El ensamble de doble haz incluye una lámpara de deuterio que mide toda la absorbancia no atómica, dado que el rango de ancho de banda que posee es cientos de veces mayor que la línea de absorción atómica seleccionada. En tanto que el haz proveniente de la lámpara de cátodo hueco mide la absorción total: atómica y no atómica. Debido a que las absorbancias son aditivas, la diferencia de ambas mediciones proporciona un valor para la absorción atómica. El rendimiento de la absorción se optimiza por la corrección de fondo, independientemente de las intensidades de ambas fuentes.

### 2.4.4. Figuras de mérito

En espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, la sensitividad y el límite de detección son los parámetros más importantes a considerar.

### a) Sensitividad

En Espectrofotometría de Absorción Atómica la sensitividad se define como la concentración, expresada en microgramos por litro ( $\mu$ g/L), que ocasiona un descenso del 1% de la luz incidente, es decir que produce una absorbancia de 0,0044. Expresada de esta forma se denomina también como concentración característica. Cuando el valor se expresa en unidades de masa, generalmente en picogramos, se le conoce como masa característica. En la siguiente tabla se muestran las masas características en horno de grafito para algunos elementos.



Elemento	Masa característica (pg)	Elemento	Masa característica (pg	
Ag	1,02	Mg	0,32	
Al	6,1	Mn	1,4	
As	7,9	Na	0,42	
Au	6,5	Ni	5,82	
Ве	0,37	Р	2800	
Bi	18,4	Pb	8,5	
Cd	0,44	Pd	15,0	
Со	4,11	Rb	2,2	
Cr	1,57	Sb	12,6	
Cs	2,37	Se	9,5	
Cu	2,24	Si	12,4	
Fe	3,18	Sn	13,5	
Ga	9,5	Те	9,7	
Ge	10,5	TI	9,9	
Hg	68,8	Tm	2,7	
In	8,6	Yb	0,88	
K	0,59	Zn	0,42	
Li	0,43			

#### Tabla 2 masas características teóricas en absorción atómica electrotérmica

Cuando es posible, las curvas de calibración deberían ser preparadas en un rango de concentración de 20 a 200 veces este valor.

### b) El límite de detección

El límite de detección corresponde a la concentración del elemento que da una señal con una intensidad igual a tres veces el desvío estándar de una serie de mediciones hechas a un blanco analítico o una solución muy diluida, con un grado de confianza del 95%. En la práctica, las concentraciones deben ser al menos diez veces mayores que el límite de detección para proporcionar mediciones fiables. Algunos límites de detección típicos en horno de grafito, partiendo de volúmenes de inyección de 20 µL, son los siguientes:

Elementos	Límites de detección		
Zn, Cd, Mg, Ag	(0,005 – 0,05) ng/mL		
Al, Cr, Mn, Co, Cu, Fe, Mo, Ba, Ca, Pb	(0,05 – 0,5) ng/mL		
Bi, Au, Ni, Si, Te, Tl, Sb, As, Pt, Sn, V, Li, Se, Ti, Hg	(0,5 – 5) ng/mL		

### Tabla 3 Límites de detección instrumental de algunos elementos para horno de grafito

Cuando se usan alícuotas de 20  $\mu$ L a 50  $\mu$ L, los límites de detección en términos de concentración alcanzan un rango de sub-unidades de ng/mL Los límites de detección predeterminados se han establecido por acuerdo con una serie considerable de mediciones experimentales.



# 2.5. Propiedades químicas del fosfuro de aluminio y sus productos de hidrólisis

El fosfuro de aluminio es un producto sólido cuya fórmula química es AIP y su peso molecular es de 57,955301 g/mol (NIST), su número CAS es 20859-73-8. Se presenta como cristales de color gris amarillento oscuro (760 mm Hg, 20 °C) y su olor es parecido al carburo, o bien semejante al ajo pero más penetrante. El fosfuro de aluminio es un producto altamente inflamable. Es estable en seco pero reacciona con la humedad del aire liberando gas fosfina (PH<sub>3</sub>) como producto de la hidrólisis; naturalmente esta reacción también ocurre en contacto con el agua y los ácidos fuertes pero de forma más violenta y exotérmica. Algunas propiedades físicas relevantes del AIP son las siguientes:

Densidad (15°C): 2,85 g/mL Punto de fusión: 2550°C (> 1350 °C) Solubilidad en agua (20 °C): 26,0 g/l (con descomposición) Temperatura crítica: 194 °C Temperatura de autoignición: 38 °C

El AlP como plaguicida, según la presentación, se encuentra generalmente en formulaciones con una concentración entre el 55% y 60% en peso (p/p), que equivale aproximadamente a un 32,2% y 35,2% de PH<sub>3</sub> respectivamente. En algunos productos, podría encontrarse hasta un 85% de fosfuro de aluminio, sin embargo esto no es lo usual en el medio. La especificación típica en Estados Unidos por ejemplo es de 60%. **CELPHOS 56 FT**<sup>®</sup>, una de las marcas de mayor venta en Honduras y Nicaragua, y **Detia Gas**<sup>®</sup> (Bayer S.A)<sup>22</sup> contienen un 56% p/p de AlP. Comúnmente estos productos se distribuyen en envases herméticos de aluminio reforzado o en sobres de aluminio.

Según la marca, las formulaciones comerciales de AIP pueden contener otros componentes. Los comprimidos de **KILLPHOS**<sup>©23</sup> contienen materiales inertes como el carbamato de amonio, que al contacto con el aire libera amoníaco y sirve como agente delator por su olor punzante; además, contiene otros ingredientes inertes que tienen la función de agregantes y de estabilizadores, que modulan la velocidad de generación de gas fosfina. Estos agentes estabilizadores evitan una reacción exotérmica violenta, e incluso la autoignición de la fosfina en ambientes con alta humedad, proporcionando una atmósfera inerte de bióxido de carbono y amoníaco. Este producto requiere entre de 24 a 48 horas para que el fosfuro de aluminio se descomponga y libere la mayor parte de la fosfina. El periodo de mayor gasificación ocurre entre 14 horas y 48 horas después de exponer el producto a la atmósfera. Una tableta de 3,0 g de AIP, desprende 1,0 g de PH<sub>3</sub> y una perla de 0,6 g desprende alrededor de 0,2 g.

**Phostoxin**<sup>®24</sup> es una formulación sólida, presentada como pastillas, pastillones y comprimidos, compuesto por un 60% de AIP. También incluye carbamato de amonio, además de parafina, para garantizar una liberación segura y eficaz de la fosfina. Las pastillas liberan inicialmente amoníaco y dióxido de carbono, y seguidamente la fosfina. La liberación se completa entre 48 horas y 96 horas



de exposición, según la temperatura y la humedad del ambiente. En condiciones normales, 20°C y 60% de humedad, el Phostoxin<sup>®</sup> libera un 40% de la fosfina en 24 horas y un 75% a las 48 horas.

**PHOSPRO<sup>m 25</sup>** tanto en sus tabletas de aproximadamente 3 g como en sus perlas de 0,6 g contienen un 56% de AIP. Contienen otros ingredientes como carbamato de amonio (22% a 32%), parafina (2,0% a 4,5%), estearato de aluminio (0,5% a 3,0%), grafito (1,5%) y óxido de aluminio (no menos del 14,5%)

El tiempo de descomposición del AIP depende de la humedad y la temperatura ambientales, cuanto más elevadas sean estas condiciones, más rápido se produce la liberación de las fosfina. Al iniciarse la descomposición de una tableta, generalmente de color gris oscuro, empieza a tornarse menos brillante hasta tomar un color gris opaco o casi blanco. Finalmente la tableta se expande y se desintegra, dejando una pequeña aglomeración de polvo con un volumen alrededor de 5 veces mayor al original del comprimido. El residuo de polvo es principalmente hidróxido de aluminio, el cual es un compuesto prácticamente inocuo.

La fosfina es un gas ligero, con un peso molecular de 33,99 g/mol y una presión de vapor aproximadamente de 34,2 atm a 20°C y de 51,9 atm a 40°C. Su punto de fusión es de -133,5°C y su punto de ebullición es de -87,4°C. Su solubilidad en agua es sumamente baja, alrededor de 0,04 g/100 g (20°C), en tanto que es soluble en éter, alcohol y la mayoría de los solventes orgánicos. La fosfina también puede ser disuelta en cloruro de cobre.

Las electronegatividades del fósforo y del hidrógeno en la fosfina son muy cercanas, de manera que pueden considerarse como cargas  $H^0$  y  $P^0$ , por tanto no se ioniza ni altera el pH del medio significativamente. Puede actuar como una base muy débil por la siguiente reacción:

 $PH_3 + H_2O \rightarrow PH_4^+ + OH^-$ 

Conocido también como fosfano y fosfamina, se cataloga como análogo al NH<sub>3</sub>. Se une con los hidrácidos para formar compuestos semejantes a las sales amónicas, por ejemplo: El ion fosfonio  $(PH_4^+)$  es a su vez análogo al ion amonio  $(NH_4^+)$ , siendo más soluble en los medios acuosos y con un carácter ligeramente ácido.

 $PH_3$  + HCl  $\rightarrow$  H<sub>4</sub>PCl

La fosfina en estado gaseoso puede reaccionar con el oxígeno atmosférico produciendo ácido fosfórico, según la siguiente reacción:

$$PH_3(g) + 2O_2 \rightarrow H_3PO_4(g)$$

La fosfina también puede condesar y producir difosfina,  $P_2H_4$ , el cual es causante del hedor característico de los productos comerciales, a lo que se suman las fosfinas órgano sustituidas, las cuales también producen esta fetidez. Estas especies originan el olor típico, semejante al ajo o



pescado podrido en los tejidos afectados por la intoxicación aguda con tales productos. La fosfina pura es en sí misma un gas inodoro.

El proceso de liberación de fosfina durante la intoxicación por ingesta de fosfuro de aluminio, se puede resumir en las siguientes reacciones químicas:

I- La reacción química del AIP al entrar en contacto con el agua del medio, desde la cavidad bucal (pH neutro) hasta el estómago.

 $AIP + 2H_2O \rightarrow AI(OH)_3\downarrow + PH_3$ 

Esta reacción es inmediata. El hidróxido de aluminio se distribuye en medio neutro según su constante de solubilidad. Ante la presencia de HCl, uno de los componentes del jugo gástrico, se producen especies mixtas o clorohidróxidos de aluminio, los cuales también son poco solubles.

Al(OH)₃	+	HCI	$\rightarrow$	AI(OH)₂CI	+	H <sub>2</sub> O
Al(OH)₂Cl	+	HCI	$\rightarrow$	AI(OH)Cl <sub>2</sub>	+	H <sub>2</sub> O
Al(OH)Cl₂	+	HCI	$\rightarrow$	AICI <sub>3</sub>	+	H₂O

II- La reacción del AIP al entrar en contacto con el HCl del jugo gástrico:

La molécula se hidroliza produciendo fosfina (PH<sub>3</sub>) y tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) que son la base débil y el ácido débil respectivamente. El AlCl<sub>3</sub> a su vez posee propiedades anfóteras.

 $AIP + 3HCI \rightarrow PH_3(g) + AICI_3(ac)$ 

Estos productos pueden formar otros compuestos con el exceso de HCl El cloruro de aluminio posee propiedades ácidas y es propenso a formar complejos con los iones cloruros.

Ante un exceso de HCl, las reacciones anteriores podrían extractarse de la siguiente manera:

 $AIP + 4HCI \rightarrow AICl_4(ac) + PH_4(ac)$ 

Esta reacción sugiere un consumo significativo del HCl, de hecho esto se verifica al observar que el pH de los contenidos estomacales incrementa generalmente a niveles cercanos a la neutralidad en los casos de ingesta de AIP.



El ion fosfonio se encuentra en equilibrio con la fosfina, disminuyendo su concentración a medida que esta última se desplaza a otros compartimentos. En tanto que el cloruro de aluminio interactúa con otros compuestos químicos presentes en el medio, produciendo nuevas especies por reacciones ácido base, formación de complejos y precipitación (ver **2.6.2** y **2.6.3**).

Otros componentes que contienen aluminio en las formulaciones comerciales de AIP pueden precipitar o bien formar otras especies hidrosolubles, como el óxido de aluminio y el estearato de aluminio.

De esto se puede establecer como hipótesis, que consecuente a la ingesta de fosfuro de aluminio han de esperarse altas concentraciones de aluminio acuoso, mayor de lo que podrían generar otras fuentes, en especial los antiácidos a base de este elemento.

## 2.6. El aluminio

Para el desarrollo del método analítico se deben reconocer las propiedades del analito. Es importante tomar en cuenta tanto el pH como la saturación de las especies del aluminio, asimismo es necesario considerar la presencia de otros iones en la matriz acuosa cuando se efectúen mediciones de aluminio disuelto.

### 2.6.1. Propiedades generales

El aluminio es un elemento metálico perteneciente al grupo IIIA de la tabla periódica, con un peso molecular de 26,9815386(8) g/mol<sup>26</sup>. Posee un isótopo, <sup>27</sup>Al, con peso molecular de 27,98153844(14) g/mol (NIST).

Tiene un carácter anfótero, es monovalente con un número único de oxidación de 3+.

Es un átomo pequeño y altamente cargado, con un radio iónico de 0,054 nm. Su estructura cristalina es cúbica, centrada en las caras.

Su conductividad térmica y eléctrica es alta. Su calor de combustión es de 200 kcal/atm⋅g y su calor específico de 930 J. El punto de ebullición se encuentra entre los 2057°C y 2480°C.

Es el elemento más abundante de la litosfera y se encuentra predominantemente en el ambiente en forma de óxidos (bauxita) y complejos de aluminosilicatos, los cuales constituyen un 8% de la corteza terrestre. Se utiliza profusamente en la industria para el tratamiento de innumerables productos y es extensamente utilizado en preparaciones farmacéuticas para disminuir la acidez estomacal, la mayoría de estas especialidades son elaboradas a base de productos poco solubles de aluminio (hidróxido, aceglutamida, carbonato trimagnésico y glicinato de aluminio entre otros)

Debido a su abundancia y amplia utilización para la producción de bienes de consumo, incluso para insumos de laboratorio (por ejemplo para la fabricación de vidrio Pyrex<sup>®</sup>), se debe tener presente el alto riesgo de contaminación de las muestras durante el proceso analítico para la determinación de trazas de aluminio.



### 2.6.2. Especiación y reacciones químicas en medios acuosos

El aluminio III (Al<sup>3+</sup>) es una especie muy reactiva y difícilmente se encontrará en la naturaleza en su estado libre.

Se considera un ácido, con un valor de pKa de 5,0. Debido a su carga, en soluciones acuosas a pH menores que 5,0 se coordina con seis moléculas de agua en una configuración octaédrica,  $Al(H_2O)_6^{3+}$ , esta especie se abrevia como  $Al^{3+}$ ; en tanto que en soluciones menos ácidas el complejo sufre procesos de hidrólisis produciendo las especies  $Al(H_2O)_5(OH)^{2+}$  y  $Al(H_2O)_4(OH)_2^+$ , las cuales se abrevian como  $Al(OH)^{2+}$   $Al(OH)_2^+$ , respectivamente.

La química del aluminio en medios acuosos depende ineludiblemente del pH. Mientras es muy insoluble a pH cercanos a la neutralidad, incrementa su solubilidad significativamente en condiciones ácidas (pH < 6,0) o básicas (pH > 8,0) y/o en presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos. En un rango de pH neutro, el aluminio es mayormente precipitado como Al(OH)<sub>3</sub>. En soluciones básicas el precipitado redisuelve en forma de complejo tetraédrico Al(OH)<sub>4</sub>.Los equilibrios entre las especies mononucleares en soluciones acuosas pueden ser expresados por las siguientes reacciones con sus correspondientes constantes de equilibrio:

$$AI(H_2O)_6^{3^+} + H_2O \implies AI(H_2O)_5(OH)^{2^+} + H_3O^+$$
  

$$K_{a_1} = 10^{-5,5}$$
  

$$AI(H_2O)_5(OH)^{2^+} + H_2O \implies AI(H_2O)_4(OH)_2^+ + H_3O^+$$
  

$$K_{a_2} = 10^{-5,6}$$

En general, las soluciones de sales inorgánicas de aluminio son ácidas debido al proceso de hidrólisis.

La desprotonación de dos puentes de agua del  $Al(H_2O)_4(OH)_2^+$  producen especies solubles de tetrahidroxialuminio.

$$AI(H_2O)_4(OH)_2^+ + 2H_2O \implies AI(H_2O)_2(OH)_4^- + 2H_3O^+ Ka_4 = 10^{-12,1}$$

En un estudio de distribución de especies de aluminio mononucleares en soluciones acuosas, a 25°C y una fuerza iónica constante de 0,16, se observó que el  $Al^{3+}$  prevalece en medio inferiores a pH 5,0; en un rango entre 5,0 y 6,2 coexiste una mezcla de especies de  $Al^{3+}$ ,  $Al(OH)^{2+}_{2}$ ,  $Al(OH)^{2+}_{2}$  y  $Al(OH)_{3}$  coloidal; en medios con pH superiores a 6,2 la especie dominante es el  $Al(OH)_{4}^{-}$ 

Pueden producirse naturalmente otras especies a partir de aniones, ácidos y otros metales presentes en el medio. Las especies formadas poseen diferentes características de solubilidad y estabilidad en sistemas acuosos. El acetato de aluminio es soluble, mientras que el acetato básico, Al(OH)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, es insoluble; de hecho , se puede separar el aluminio de otros metales como el



hierro, a través de esta propiedad. El acetato de aluminio se descompone por ebullición, formando el acetato básico insoluble:

 $AI(CH_3CO_2)_3 + 2H_2O \rightarrow AI(OH)_2(CH_3CO_2)\downarrow + 2CH_3CO_2H$ 

Los oxalatos precipitan el  $Al^{3+}$  en mucha menor medida. Con los iones fosfatos forma una sal insoluble en agua, lo mismo que el sulfato de aluminio anhidro. Las mezclas de dobles sulfatos con metales alcalinos, por ejemplo  $M^{1}Al(SO_{4})_{2}*12H_{2}O$ , o sales de amonio  $(NH_{4}^{+})$ , son menos solubles también. En tanto que los cloruros son delicuescentes, pero solubles.

El aluminio también es atacado por los carbonatos acuosos, precipitando como óxido de aluminio acuoso, de acuerdo a la reacción:

 $2AI^{3+}$  +  $6CO_3^{2-}$  +  $3H_2O$   $\longrightarrow$   $AI_2O_3ac$  +  $6HCO^{3-}$ 

El aluminio es ligeramente soluble en presencia de carbonatos, y mucho menos en presencia del ión bicarbonato. Otros aniones también precipitan al Al<sup>3+</sup> en forma de óxido de aluminio acuoso, tal es el caso del cianuro y los cromatos alcalinos

Aniones, tales como los halogenuros, S<sup>2-</sup>, y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, no forman complejos significantes con el aluminio.

El ión ferrocianuro en medio acuoso produce con el Al<sup>3+</sup> un precipitado blanco que gradualmente se torna verde, lentamente en frío y con más rapidez en calor.

Algunos compuestos orgánicos de bajo peso molecular interactúan con el aluminio formando complejos estables, tales como ácidos grasos simples, carbohidratos ácidos, ácidos fenólicos, fenoles y complejos fenólicos polinucleares. En general, los grupos carboxílicos y fenólicos pueden reaccionar con el aluminio formando complejos. Ácidos carboxílicos como el fórmico, acético, propiónico, butírico y oxálico, y ácidos hidroxicarboxílicos tales como el láctico, tartárico y cítrico son capaces de competir por el Al<sup>3+</sup> y algunos pueden formar complejos tan fuertes que sustituyen ligandos inorgánicos. Los iones monocarboxilatos producen complejos hidrosolubles del tipo  $Al(RCO_2)_2^+$  y  $Al(RCO_2)_2^{++}$ , pero con menor estabilidad.

El Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acuoso, recién precipitado, reacciona con el ácido fórmico, produciendo cristales de Al(OH)(HCO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, y en exceso del ácido, Al(HCO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O. El ión citrato puede solubilizar el aluminio de fosfatos e hidróxidos precipitados, actuando como un quelante mono-, di- o tridentado. Tales ácidos y sus sales impiden o previenen la precipitación del Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acuoso, independientemente del pH del medio.

El ácido cítrico ha resultado sumamente útil para estabilizar especies de aluminio, incluso aquellas insolubles. Dabbs y colaboradores<sup>27</sup>, encontraron que el ácido cítrico puede actuar como agente para incrementar la solubilidad de oxihidróxidos en soluciones acuosas con alta proporción [OH<sup>-</sup>]/[Al] (>2,47 mol/mol). El ácido cítrico también estabiliza las partículas en suspensión que contengan aluminio, esto cuando el ácido cítrico se encuentra igualmente en estado coloidal. Las



soluciones con cloruro de aluminio pueden polimerizar en medios básicos, pero en presencia del ácido cítrico, en una proporción [ácido cítrico]/[aluminio] de 0,8, la formación de policationes es reducida eficazmente, incluso cuando la relación [OH-]/[Al] sobrepasa una razón de 3,29 mol/mol. De hecho, cuando la proporción [ácido cítrico]/[aluminio] se aproxima a la unidad, se previene totalmente la nucleación de las partículas suspendidas.

Él ácido cítrico compleja preferencialmente a los cationes de aluminio, reduciendo la probabilidad de polimerización; en tanto que las moléculas policatiónicas de aluminio son desintegradas sistemáticamente por este ácido o forme complejos con pequeños "clusters" poliatómicos. De manera que en suspensiones la adición de ácido cítrico puede ser útil para estabilizar las partículas existentes, limitando o previniendo el crecimiento de las mismas; mientras que en soluciones de aluminio catiónico retarda significativamente el crecimiento de partículas ante la adición de bases fuerte. Las soluciones de Al<sup>3+</sup> en sistema cerrado, conteniendo ácido cítrico en una relación [ácido cítrico]/[aluminio] de 0,82 pueden permanecer incoloras, sin partículas detectables, durante semanas a temperatura ambiente.

Existe evidencia de interacción entre el aluminio y el sílice, recientemente, hidroxialuminosilicatos han sido directamente identificados en soluciones ácidas.

El  $Al^{3+}$ , puede ser cristalizado como nitratos, sulfatos o percloratos hidratados, formando por ejemplo  $[AlSO_4(H_2O)_5]^+$  con el ácido sulfúrico.

El Ácido nítrico es pasivo ante el aluminio, pero en presencia de pequeñas cantidades de algunos otros iones, por ejemplo  $Hg^{2+}$ , lo disuelve rápidamente, formando NO cuando se ha tratado con  $HNO_3$  concentrado, y  $NH_4NO_3$  cuando se ha tratado en  $HNO_3$  diluido.

El ácido fosfórico en medio acuoso, compleja fuertemente el  $Al^{3^+}$ , produciendo fundamentalmente  $[Al(HPO_4)_3]^{3^-}$ , pero también polímeros y otras especies protonadas. No obstante, el  $Al^{3^+}$  puede ser separado del ión  $PO_4^{3^-}$  por disolución con HCl, adicionando ácido tartárico, NH<sub>3</sub> e hidróxido de magnesio. Digiriendo por un tiempo, se produce MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> precipitado. También el fosfato puede ser precipitado con Sn IV, el exceso de Sn es removido más fácilmente que el ácido tartárico.

El ácido sulfúrico diluido ataca al aluminio lentamente, con liberación de hidrógeno; en tanto que el  $H_2SO_4$  concentrado lo disuelve fácilmente cuando a la vez se aplica calor, liberando  $SO_2$ . El sulfato de aluminio forma sales dobles, llamadas alumbres, con sulfatos alcalinos. Quizás el más conocido es el lumbre común, KAl( $SO_4$ )<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O. Los alumbres son usualmente menos solubles que sus sulfatos constituyentes y pueden ser cristalizados adicionando una solución saturada del álcali sulfato a una solución saturada de sulfato de aluminio.

Los ácidos HCl, HBr y HI, ya sea diluidos o concentrados disuelven fácilmente al aluminio, liberando hidrógeno y produciendo especies como el  $[Al(H_2O)_6]Cl_3$  por ejemplo.

El aluminio también tiene la capacidad de formar polímeros. Cuando el pH de una solución acuosa ácida se incrementa, la densidad de carga del aluminio disminuye debido a la hidrólisis, y el



elemento comienza a polimerizar. Las especies polinucleares del aluminio representan constituyentes metaestables importantes que pueden permanecer en una solución incluso durante años.

El OH<sup>-</sup> acuoso precipita con el Al<sup>3+</sup> como Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hidratado, el cual es una materia de color blanco grisáceo, gelatinosa e insoluble en el medio neutro, pero que con altas concentraciones de OH<sup>-</sup> forma complejos mononucleares y polinucleares.

La especie polinuclear más pequeña es el  $(Al_2(OH)_2(H_2O)_8)^{4+}$ , este es un dímero que se enlaza por puentes de hidróxido y no es una especie estable. El anillo de seis hidróxidos de aluminio forma una estructura octaédrica  $(Al_6(OH)_{12})^{6+}$ , el anillo doble  $(Al_{10}(OH)_{22}^{8+})$  y el triple anillo  $(Al_{13}(OH)_{30}^{9+})$ son polímeros más estables. En general, se han propuesto muchas estructuras polinucleares y complejos poliméricos del aluminio con fórmula general  $[Al_2(OH)_3]_n^{3+}$ .

Una proporción 2,5/1 de  $[OH^{-}]/[Al^{3+}]$  produce una especie persistente de  $[Al_{13}O_4(OH)_{25}(H_2O)_{11}]^{6+}$  cuyo sulfato y cloruro apenas es soluble.

La cantidad de especies polinucleares dependen de la saturación de moléculas que no tienen contacto con superficies absorbentes. También las altas temperaturas favorecen la polimerización.

Una especie común del aluminio es el óxido de aluminio, el cual es de profuso interés en el análisis de aluminio por Espectrofotometría de Absorción Atómica, debido al rol importante que juega en el proceso de atomización y absorción. Este compuesto y su hidrato son insolubles en agua.

Si no es sometido a una fuerte ignición, el óxido hidratado se disuelve fácilmente en ácidos diluidos, pero el óxido anhidro, una vez cristalizado es insoluble.

Como se ha dicho en las líneas anteriores, la especie de  $Al^{3+}$  reacciona con otros compuestos precipitando como óxido de aluminio. El aluminio puro es fácilmente oxidado a  $Al_2O_3$  ante la exposición del aire, ya sea aire húmedo o seco.

## 2.6.3. Especiación en fluidos biológicos y biodisponibilidad<sup>18</sup>.

El aluminio es pobremente absorbido después de su ingestión, en cualquiera de sus formas. Aproximadamente del 0,1% al 0,6% del aluminio ingerido es absorbido. El aluminio remanente en el estómago es eventualmente eliminado por las heces.

La biodisponibilidad del aluminio es influido fuertemente por la especiación del mismo y la presencia de constituyentes dietéticos, los cuales pueden formar complejos e incrementar o disminuir la absorción (ver **2.6.2**). Una de las formas menos biodisponibles es el hidróxido de aluminio, que puede ser tan bajo como el 0,1%.

La mayoría de los mecanismos de absorción probablemente sucedan por difusión pasiva a través de los espacios intercelulares.
El aluminio se une a varios ligandos en la sangre y se distribuye en todos los órganos, con las más altas concentraciones en los huesos y el tejido pulmonar. Los órganos blancos parecen ser el sistema nervioso central y los huesos

El aluminio absorbido es principalmente eliminado por vía urinaria y en mucha menor proporción por vía biliar.

Los niveles de aluminio en sangre tienden a incrementarse en personas expuestas a altos niveles de aluminio, tal como aquellas asociadas al uso prolongado de antiácidos. Los niveles tienden a normalizar cuando la exposición cesa.

Algunas condiciones atípicas conllevan al incremento de los niveles en el cuerpo, produciendo toxicidad, este es el caso de los pacientes con insuficiencia renal.

El aluminio puede formar complejos con moléculas del cuerpo, por ejemplo con ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, fosfatos, carbohidratos, macromoléculas, entre otras. Muchos de los compuestos que formará tienen baja solubilidad, especialmente aquellos que poseen carga neutra. La toxicocinética del aluminio puede variar, dependiendo de la naturaleza de dichos complejos. Por ejemplo, el aluminio formando un complejo de bajo peso molecular podría ser filtrado en los glomérulos y ser eliminado fácilmente, mientras los ligados a compuestos de alto peso molecular pueden quedar "atrapados" en el sistema<sup>18</sup>.

El Analytical Atomic Spectrometry Journal describe en un boletín de actualización estudios relacionados a la distribución del aluminio. En la edición 13<sup>28</sup> se reporta que Cabezuelo y colaboradores, utilizando cromatografía líquida con detección por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, lograron una separación rápida de proteínas séricas de bajo peso molecular. Los autores encontraron que la transferrina contiene el 90% del aluminio sérico, siendo prácticamente la única proteína sérica que liga al aluminio. En presencia de la desferrioxamina (DFO), el aluminio es desplazado de la transferrina para formar un guelato de bajo peso molecular, Al-DFO. En la misma edición se reporta que Ittel y colaboradores, estudiaron la absorción y compartimentalización del aluminio urémico en ratas, seguido de una administración de <sup>26</sup>AI. Observaron que en los animales la absorción fue del 0,13% y la compartimentalización ocurrió en tejidos transferrina-dependientes. Investigaciones anteriores encontraron un 81% de aluminio ligado a la transferrina y el 19% restante formando otras especies, principalmente Al(PO<sub>4</sub>)(OH), y en cantidades minoritarias citratos e hidróxidos<sup>29</sup>. Se llevaron a cabo estudios similares por Jouhanneau y colaboradores. Observaron igualmente una muy baja absorción del <sup>26</sup>Al, sin embargo encontraron un incremento de la misma, de 2 a 5 veces, cuando se administró concomitantemente sales de citrato. El aluminio administrado se excretó en orina, en un periodo de 48 horas.

Se ha estimado una concentración de aluminio máxima normal de 0,8 mg/L (800  $\mu$ g/L), pero los valores normales tienden a encontrarse en intervalos muy por debajo de este nivel. En algunos estudios se han encontrado concentraciones en individuos no expuestos a contaminación por aluminio entre 0,0016 mg/L de aluminio sérico, con un rango de (0,0005 – 0,0035) mg/L y una



desviación estándar de ± 0,0008 mg/L<sup>18</sup>. Gitelman y Alderman determinaron un valor de referencia para individuos sanos de  $(3,1 \pm 1,1) \mu$ g/L (ver **2.3**)

## 2.6.4. Características espectroscópicas y atomización

El aluminio genera alrededor de 693 líneas espectrales entre 200 nm y 400 nm (NIST) y su mayor absorción se presenta a los 309,3 nm.

Existen al menos dos teorías fundamentales que explican el proceso de atomización del aluminio en el horno de grafito<sup>30</sup>:

## 2.6.4.1. Teoría de formación de carburos gaseosos

Esta teoría es planteada por L'vov y colaboradores. Para explicar los mecanismos de formación de átomos que originarán los procesos de absorción, el diseño y composición del horno de grafito juega un papel fundamental según esta teoría. Durante el proceso de atomización del aluminio se forman diversos carburos tales como Al<sub>2</sub>C, Al<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>C<sub>5</sub> y Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub> que aparecen alrededor de 100 K a 200 K (373,15°C a 473,15°C), antes de la aparición de los átomos libres y de los óxidos del metal. Estas moléculas interaccionan para originar los átomos de Al<sub>(g)</sub>. Las siguientes reacciones fueron corroboradas por medio de un Espectrofotómetro de absorción atómica y un espectrómetro de masas.

$AI_2O_{3(s/l)}$	+	$AI_2C_{(g)}$	$\rightarrow$	$2AI_2O_{(g)}$	+	CO
$AI_2O_{(g)}$	+	2C <sub>(s)</sub>	$\rightarrow$	$AI_2O_{(g)}$	+	2CO
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (s/l)	+	2C(s)		Al <sub>2</sub> O(g)	+	2CO

El modelo propuesto gira sobre el hecho de que el óxido metálico es directamente reducido por moléculas gaseosas de carburos metálicos que a su vez interaccionan con los óxidos del aluminio para formar aluminio metálico, proponiéndose las siguientes ecuaciones:

Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (s/l)	+	1,5AIC <sub>2</sub> (g)	<b>→</b>	3,5Al(g)	+	3CO
2AIO <sub>(g)</sub>	+	AIC <sub>2(g)</sub>		3Al <sub>(g)</sub>	+	2CO

Los carburos metálicos se forman por interacción del  $Al_{(g)}$  con el carbono  $C_{(s)}$  en la superficie del tubo de grafito.

$$AI_{(g)}$$
 +  $2C_{(s)}$   $\longrightarrow$   $AIC_{2(g)}$ 

La formación de AlO provendría de la reacción:

$$2AI_{(g)} + O_2 \longrightarrow 2AIO_{(g)}$$



De esta forma, el aluminio generado primeramente origina a su vez una serie de reacciones a través de los carburos que darán lugar a una mayor aparición de átomos de aluminio.

Se ha propuesto que el esquema anterior de reducción del  ${\sf Al}_2{\sf O}_3$  podría completarse según las reacciones

$AI_2O_3(s/I)$	+	Al <sub>2</sub> C(g)	$\rightarrow$	$2AI_2O(g)$	+	CO
$AI_2O(g)$	+	2C(s)	$\rightarrow$	$AI_2O(g)$	+	2CO
$AI_2O_3(s/I)$	+	2C(s)	$\rightarrow$	Al <sub>2</sub> O(g)	+	2CO

El  $Al_2O_{(g)}$  formado originaría consecuentemente  $Al_{(g)}$  por reacción con los carburos de aluminio, de manera similar a como sucede con el AlO.

En esta teoría serían los carburos del metal los principales responsables de la formación de átomos en vez de los óxidos metálicos.

## 2.6.4.2. Teoría de la reducción autocatalítica del Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Marc M. Lamoureux y colaboradores, han propuesto un mecanismo de formación del aluminio a partir de los trabajos de Gilmutdinov y colaboradores, que usaron una cámara de cine equipada con una película sensible a la luz U.V. para filmar el interior del horno de grafito durante la fase de atomización.

Lamoureaux *et al*, en el trabajo citado, emplean un equipo diseñado específicamente para permitir la medición simultánea de los átomos de aluminio por espectroscopía de absorción atómica, de las moléculas con aluminio por espectroscopía de absorción molecular y un ICP-MS conectado al horno de grafito para identificar las diversas especies moleculares. Para recoger las sombras de los espectros formados emplearon la técnica de Gilmutdinov y colaboradores de filmación espectral de la sombra o Shadow Spectral Filming (SSF) y la técnica de Chakrabarti et al de recogida de imágenes mediante digitalización espectral de la sombra o Shadow Spectral Digital Imaging (SSDI). Estas técnicas han permitido estudiar la distribución espacial de los átomos de aluminio y de las moléculas conteniendo este elemento.

A partir de aquí, se han postulado las interacciones que pueden ocurrir entre las especies que contienen aluminio, el oxígeno presente dentro del tubo y la superficie del grafito. De esta forma se ha podido observar que las principales especies detectadas por el ICP-MS han sido: Al, AlO, Al<sub>2</sub>O y AlC<sub>2</sub>.

Además de los espectros de absorción recogidos durante la atomización del aluminio, correspondientes al metal en estado atómico y en diversas moléculas, todas las imágenes mostraron un perfil similar en forma de *"donut"* donde la absorción es mayor en las proximidades de las paredes de grafito para posteriormente ir decreciendo hacia el interior del tubo. Esto es mucho más aparente en ausencia de flujo de argón, y menos notorio con un flujo de gas de 50 mL/min.

Gilmutdinov y colaboradores, proponen una formación inicial de subóxido de aluminio vaporizado  $Al_2O(g)$  que sería transformado a continuación en  $Al_2O_3$  merced a la reacción de la primera molécula con el oxígeno que entra en el orificio de dosificación.

Por su parte, L'vov sugiere que la formación de la estructura de "donut" proviene de la condensación de las especies en fase vapor en la porción final del tubo que está más frío. Estas especies serán principalmente Al y  $Al_2O_3$ .

A partir de aquí, Lamoureux y colaboradores han propuesto el siguiente mecanismo de formación del pico de aluminio.

Durante el pretratamiento térmico y antes de la atomización, el residuo de la solución de aluminio desecado se convierte en  $Al_2O_3$  en el rango de temperaturas entre 500°C y 1000°C. La disociación térmica ocurre lentamente a temperaturas por debajo de 2050°C (el punto de fusión del  $Al_2O_3$ ).

Aunque la disociación térmica del  $Al_2O_3$  es una posible fuente de átomos de aluminio en estado gaseoso, el paso más favorable para la formación del Al(g) es la disociación térmica de los carburos de aluminio. Estas moléculas y los oxicarburos juegan un papel importante en la producción de aluminio elemental por fusión carbotérmica. El carburo de aluminio fase condensado  $[Al_4C_3(s,I)]$  cuya presencia se ha informado durante la atomización del Al, es formado a través de las siguientes reacciones:

$2AI_2O_3(s)$	+	3C(s)	$\rightarrow$	Al <sub>4</sub> O <sub>4</sub> C(s)	+	2CO(g)	(1)
Al <sub>4</sub> O <sub>4</sub> C(s)	+	6C(s)		Al <sub>4</sub> C <sub>3</sub> (s)	+	4CO(g)	(2)

Que originan la reacción global:

 $2AI_2O_3(s) + 9C(s) \longrightarrow AI_4C_3(s/I) + 6CO(g)$  (3)

La formación del oxicarburo (ecuación 1) se produce rápidamente a temperaturas superiores a 1450°C y la reacción global (ecuación 3) a 1810°C.

Kantar *et al* informaron que la reacción descrita por la ecuación 3 puede ocurrir por agentes reactantes mezclados desigualmente a elevadas concentraciones y es altamente exotérmica. De todas maneras el Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub> solo puede ser formado si el Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> está en contacto íntimo con el sustrato de grafito y la reacción ocurre preferiblemente en los sitios activos como roturas y otros defectos. De esta manera, bajo las condiciones de formación del pico de aluminio, solo una pequeña fracción del mismo se podría esperar que estuviera en la forma de Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub> y la mayoría del aluminio permanecería como Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. El carburo de aluminio Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub> podría ser generado a una temperatura superior a su punto de fusión de 1400°C y aparecería como un líquido fundido con algo de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> disuelto en él. La exotermicidad de la acción representada por la ecuación 3 hace razonable esperar que algo de Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub> se vaporice y posteriormente se disocie en la fase gaseosa para formar átomos de aluminio:



$$AI_4C_3(g) \longrightarrow 4AI(g) + 3C(s)$$
 (4)

Los átomos de aluminio formados por disociación del  $Al_4C_3(g)$  pueden actuar como semillas que generarán una reacción en cascada donde el aluminio reaccionará con el  $Al_2O_3$  para dar:

 $AI_2O_3(s) + 4AI(g) \longrightarrow 3AI_2O(g)$  (5)  $AI_2O_3(s) + AI(g) \longrightarrow 3AIO(g)$  (6)

Motzfeldt y Steinmo indicaron que se formaba preferentemente  $Al_2O(g)$  en lugar de AlO(g). Basándose en consideraciones de equilibrio, estos autores establecieron que la presión parcial de  $Al_2O$  (p $Al_2O$ ) aumentaba mucho más rápidamente que la presión parcial de AlO (pAlO) conforme aumentaba la presión parcial de aluminio elemental (pAl). De esta manera el mecanismo propuesto sólo consideraría la formación del  $Al_2O$ . De todos modos parece ser que se precisa un cierto valor de presión parcial de Al(g) necesario para que la reacción con el  $Al_2O_3$  (ecuación 5) pueda comenzar. Tras la formación del  $Al_2O(g)$  sucede una reacción en cadena sobre la superficie del grafito según la ecuación:

 $3Al_2O(g) + 3C(s) \longrightarrow 6Al(g) + 3CO(g)$  (7)

De esta manera cada vez que se forman 4 átomos del Al(g) (ecuación 4) se generan 6 átomos de Al(g) (ecuación 7) lo que supone una multiplicación por un factor de 1,5.

Este mecanismo autocatalítico requiere que:

El Al y Al<sub>2</sub>O estén presentes simultáneamente en la fase gaseosa. El Al<sub>2</sub>O sea el precursor significativo de la formación de átomos de Al La distribución espacial de Al y Al<sub>2</sub>O sean complementarias

Estas premisas son consistentes con los resultados obtenidos de las medidas simultáneas de espectrofotometría de absorción atómica, espectrometría de masa e ICP-Masas. El pico de aluminio desaparece además de por falta de suministro de aluminio, porque pueden ocurrir cualquiera de los siguientes factores limitantes:

El equilibrio en la presión parcial del Al (pAl) sobre el Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub>(s/l) (que es aproximadamente 105 veces mayor que sobre el Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(s)); y La pCO gobernada por la ecuación 7.

Cuando se alcanza cualquiera de ambas se pueden originar una serie de reacciones reversibles que terminarán la formación del pico de Al. Así el Al<sub>2</sub>O y el CO o el O<sub>2</sub> pueden reaccionar para generar partículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o el Al y el CO pueden reaccionar también para formar partículas de Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub> y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> todas ellas dispersadas en la fase gaseosa. Del mismo modo, también es posible que algunas especies en fase vapor condensen en las zonas más frías del tubo.



Todo esto es consistente con la observación por diferentes técnicas de fotografía de espectros de las estructuras de *"donut"* que son atribuidos tanto a la formación del  $Al_2O_3$  como a la condensación de otras especies en los puntos fríos del tubo. Cuando se alcanza la temperatura apropiada de formación de Al, de nuevo se repite todo el proceso y las reacciones 5 y 7 se acoplan dando lugar a la formación del Al.

El mecanismo propuesto para la formación del pico de Al es probablemente una parte de un conjunto de fenómenos más complejos en los que intervendrán especies como AlH o incluso Al<sub>2</sub> que se sabe que existen cuando aparece el pico de aluminio y que no se ha considerado por los autores en el mecanismo propuesto. Existen otras reacciones durante el desarrollo de las etapas programadas en la cámara de grafito. De hecho el gas circulante, nitrógeno en el caso del Laboratorio, y el oxígeno presente en el medio pueden intervenir. El nitrógeno reacciona a altas temperaturas formando nitruros con el aluminio y óxido nitroso con el oxígeno. A la vez, el hidrógeno formado en otras reacciones puede convertirse en ácido cianhídrico con el carbono de la cámara de grafito, cuando se superan los 1800°C

# 2.7. La Matriz biológica: el contenido gástrico<sup>31</sup>

Un aspecto importante para el desarrollo del método es comprender la naturaleza de la matriz de trabajo y los requerimientos para su manipulación preanalítica.

El contenido gástrico es la mezcla del jugo gástrico con alimentos y/o sustancias ingeridas. El vómito y el lavado gástrico también pueden ser catalogados como contenido gástrico, sin embargo, para efectos del presente estudio, se restringe esta definición a la mezcla recolectada del saco estomacal durante la autopsia.

La naturaleza de este espécimen puede ser muy variable, tanto entre contenidos de un mismo individuo como especímenes de distintas fuentes. Generalmente, requiere un proceso de tratamiento previo la homogenización, seguido de una filtración y/o centrifugación. Su naturaleza es totalmente heterogénea, de manera que puede considerarse como una solución, suspensión y emulsión a la vez.

Debe ser tomado en cuenta que la presencia de toda una gama de compuestos químicos de origen dietéticos y/o no dietéticos conforma una población desconocida e impredecible. Pueden estar presente ácidos grasos, triglicéridos, azúcares, sales inorgánicas, entre muchos compuestos más, que originan una especiación, en este caso del aluminio, fuera de cualquier pronóstico.

El pH del contenido gástrico originalmente es ácido, oscilando en un valor de 2 unidades, a menos que una o más sustancias ingeridas alteren los equilibrios ácido-base, por ejemplo los antiácidos y los alcaloides tienden a incrementar el pH. Se ha verificado en el Laboratorio que los contenidos estomacales de individuos que ingirieron fosfuro de aluminio tienden a un pH más alto de lo normal, quizás como consecuencia del consumo de ácido clorhídrico para producir cloruro de aluminio y seguidamente los hidróxidos, alcalinizando un medio eminentemente ácido.



Las características organolépticas, especialmente el olor y color, pueden cambiar por una diversidad de sustancias tóxicas, un olor penetrante a ajo puede sugerir una intoxicación por ingesta de fosfuro metálico o de arsénico, mientras el color oscuro o la presencia de precipitado color grisáceo, negruzco y/o metálico son con frecuencia coincidentes con la ingestión de fosfuro de aluminio.

Es importante registrar el volumen total de contenido gástrico para calcular la cantidad total del analito presente en el estómago. Dado que el contenido gástrico es sumamente heterogéneo, en la medida de lo posible debe ser remitida la totalidad del espécimen al toxicólogo. Si esto no es posible, el volumen total debe ser informado al laboratorio.

El disector debería atar los extremos del estómago y es recomendable abrirlo lejos de los demás tejidos y fluidos para evitar la contaminación por otra víscera.

# 2.8. Factores para el desarrollo de un método analítico de determinación de aluminio en contenido gástrico

En el desarrollo de la metodología aplicada en el Laboratorio Químico Toxicológico se observaron algunos problemas analíticos que se resumen en la introducción de este protocolo. Estos aspectos han sido estudiados y se han realizado algunas pruebas experimentales para su resolución.

## 2.8.1. Rango efectivo de trabajo

El objetivo del método es abarcar los niveles esperados. En base a la experiencia de este laboratorio, se han encontrado en muestras diluidas niveles tan altos como 109,2 mg/L; sin embargo, los valores oscilan típicamente alrededor de 6077  $\mu$ g/L (6,077 mg/L), conforme al procedimiento aplicado. Esta concentración resulta luego de que 1,0 g de contenido gástrico se diluye adicionando 10 mL de HCl 10%, y equivale en realidad a aproximadamente 668447  $\mu$ g/L (66,847 mg/L) en la matriz original.

En pruebas previamente realizadas en el Laboratorio Químico Toxicológico se logró obtener linealidad hasta un rango de 15  $\mu$ g/L a 150  $\mu$ g/L, utilizando HCl 10% como solvente, Para esto, se diluyó una alícuota de 0,9 mL de Al estándar (1000 mg/L) a un volumen de 100 mL y luego se transvasaron 15  $\mu$ L a un vial donde se adicionó 1,5 mL de HCl 10%. Pero este procedimiento presenta problemas de reproducibilidad. Más allá de este límite máximo fue imposible obtener una relación física proporcional y consecuentemente un modelo matemático apropiado en HCl 10%. Un set de calibradores de prueba, de AlCl<sub>3</sub> disuelto en HNO<sub>3</sub> 5%, utilizando MgNO<sub>3</sub> como modificador químico, resultó lineal en un rango de 16,39  $\mu$ g/L a 163,36  $\mu$ g/L. en estudios publicados se expone que la linealidad para el aluminio es muy limitada, e inclusive por debajo de los 100  $\mu$ g/L si se define este parámetro como una función de primer orden, es decir un modelo de regresión lineal simple, por encima de este nivel la aproximaciones más apropiadas implican modelos polinómicos.



Para estimar un rango de trabajo, debe partirse de algunos supuestos teóricos sobre las concentraciones esperadas en las muestras. Considerando hipotéticamente la cantidad de aluminio que podría liberar una tableta de 3 gramos con un 57% p/p de fosfuro de aluminio, y que únicamente este ingrediente contenga dicho elemento, un comprimido en estas condiciones alcanzaría a producir alrededor de 0,7961 g de aluminio elemental; suponiendo que es ingerida y el volumen de contenido gástrico es de 200 mL, la concentración de AlCl<sub>3</sub> podría ser tan alta como 3980,5 mg/L. Sin tomar en cuenta las reacciones colaterales de precipitación y en general las especies poco solubles, sería necesario entonces que las muestras de contenido gástrico fueran diluidas en un factor no menor de 40000 para lograr una medición aproximadamente lineal de primer orden (cerca de 100  $\mu$ g/L). Este factor en realidad es mucho menor, cuando se toma en cuenta la especiación que ocurre en el medio, principalmente la formación de productos poco solubles.

No se deja de lado el hecho de que en toxicología forense los análisis son llevados a cabo fundamentalmente para comprobar el consumo de una sustancia, por tanto la información cualitativa es más relevante<sup>32</sup>. El requisito primordial de la metodología es que permita obtener valores significativamente diferentes entre las muestras negativas y las muestras positivas para fosfuro de aluminio. El rango de trabajo debe ser tan amplio que permita establecer esta diferencia. Idealmente, las muestras negativas deberían ubicarse en el extremo cercano al límite inferior de cuantificación, o incluso bajar a niveles no detectables, mientras que las muestras positivas positivas puedan ubicarse entre el punto medio y el límite superior de cuantificación, o de hecho sobrepasar dicho límite, para lo que posteriormente requeriría una dilución.

En el caso del estudio de aluminio en sangre, la situación es revertida. Por investigación documental se conoce que las concentraciones esperadas son mucho menores a los previstos en contenido gástrico, pudiendo ser menores a los 3,5  $\mu$ g/L y por mucho alrededor de 30  $\mu$ g/L. Para la medición de aluminio en sangre, un rango conveniente sería de 1  $\mu$ g/L a 100  $\mu$ g/L, suponiendo un incremento significativo por la ingesta de fosfuro de aluminio.

En ambos casos, también debe considerarse la necesidad de emplear adición de estándar como método de calibración, donde las concentraciones de aluminio efectivas serían acrecentadas.

El objetivo del estudio del rango de trabajo se resume en la búsqueda del intervalo de linealidad instrumental efectivo más alto que sea posible y que pueda ser estimada por un algoritmo matemático adecuado, para la cuantificación de aluminio en contenido gástrico. En tanto que para la medición de aluminio en sangre un rango más conveniente sería de 10  $\mu$ g/L a 100  $\mu$ g/L, o tan bajo como sea posible y necesario.

## 2.8.2. Curvatura en los gráficos de calibración <sup>20 33 34</sup>

La técnica de absorción atómica en última instancia, produce una señal que se mide en unidades ópticas, típicamente, en unidades de absorbancia. El operador deberá de alguna manera convertir absorbancia a unidades de concentración con el fin de obtener el resultado analítico. Idealmente, la relación entre la absorbancia y la concentración debería ser lineal y la ley de Beer-Lambert podría aplicarse exactamente, pero en la práctica siempre existen una o más desviaciones. Incluso



en un rango limitado de concentración, la curvatura en las gráficas de calibración es casi inevitable. Algunas de las causas diseño de esta curvatura se atribuyen al diseño del instrumento, otras pueden originarse en las condiciones experimentales utilizadas. Por ejemplo, el grado de curvatura de níquel en los 232,0 nm longitud de onda está controlado por el ancho de banda espectral elegido para el monocromador, porque la curvatura surge de la superposición de una segunda línea, cercana en el espectro de níquel. En la práctica, debido a la configuración del equipo, no es posible eliminar esta curvatura completamente. Existen más causas fundamentales para la calibración curvilínea que la relación con el grado de solapamiento en perfiles de las líneas de la emisión y absorción.

La curvatura no está bajo el control total del operador. Ya que varía de un elemento a otro, no se puede eliminado por completo debido al diseño instrumental; por ello, se han desarrollado diversos dispositivos para compensarla y proporcionar una concentración de calibrado en los instrumentos de absorción atómica. De manera que la espectrofotometría de absorción atómica es una técnica comparativa, más que una técnica absoluta.

El espectrofotómetro debe estar calibrado contra una serie de soluciones de concentración conocida (patrones) para generar un gráfico de calibración. Usualmente, estos gráficos no muestran un comportamiento ideal, dando por lo menos una de tres diferentes tendencias:

#### Curvatura cóncava

Las curvaturas cóncavas son poco frecuentes, en este caso la absorbancia atómica incrementa en una proporción excesivamente ascendente con respecto al incremento de la concentración del analito. Los algoritmos cuadráticos en estas curvas tienden a fallar y no son deseables para el trabajo analítico.

#### Curvatura asintótica (convexa)

La curvatura asintótica es el comportamiento más común en espectrofotometría de absorción atómica, especialmente cuando se trabajo en altos rangos de concentración. A medida que la concentración aumenta, la señal se viene siendo paralela al eje X. Este asintotismo significa que por sobre cierto nivel de concentración el valor de absorbancia no aumenta del todo.

#### Curvatura parabólica

Por sobre un determinado nivel de concentración, la gráfica no incrementa ni tiende al paralelismo, sino que "regresa" al eje X, y la tendencia se observa entonces como una parábola. Este patrón se le conoce por su término en inglés como "roll-over". Esto implica que dos concentraciones diferentes darán la misma señal de absorbancia. Calibraciones en tales condiciones no son adecuadas, a menos que se conozca con anticipación la concentración esperada del analito.

La operación de calibración automática, como generalmente se trabaja en el laboratorio, parte de dos supuestos: que la longitud del paso a través de la población de átomos es constante y que el coeficiente de absorción atómica es también constante. Los espectrofotómetros están diseñados para lograr la veracidad de ambos supuestos. El diseño de los equipos procura con el mayor esfuerzo posible que la longitud del paso sea estable. Los coeficientes de absorción dependen de



una cantidad física llamada fuerza del oscilador. Esta constante implica un arduo trabajo para asegurar su exactitud y aún se debate sobre la fidelidad de la misma para algunos elementos. De esta forma se pretende disminuir en la mayor medida posible las fuentes de error en la calibración; de manera que el operador únicamente debe ajustar el instrumento de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Aún así, la mayoría de los gráficos no trazan una línea recta, a pesar de los intentos para linealizar estos sistemas

La curvatura en los gráficos de calibración no es un problema en términos matemáticos. Existe una considerable diversidad de algoritmos que pueden ser aplicados para trazar una línea de ajuste a través de los puntos obtenidos. La dificultad radica en cuál algoritmo utilizar. La mayoría de los espectrofotómetros facilitan al usuario un número de algoritmos comunes, como la aproximación lineal simple, cúbica y la cuadrática por ejemplo. La disponibilidad de todos los datos numéricos permitirá determinar cuál es el ajuste más apropiado. Este proceso de selección puede darse durante o después del análisis. Los sistemas computarizados pueden entonces adecuar los gráficos curvilíneos de calibración e interpolar una concentración. Empero, existe un peligro potencial en algunos casos donde los gráficos de calibración pueden dar lugar a resultados falsos o engañosos. El analista debe efectuar las acciones correctivas pertinentes o interpretar los resultados cuidadosamente.

En la espectrofotometría termoeléctrica las interferencias son más comunes que en el sistema de atomización de llama. El horno de grafito se emplea en análisis de trazas, donde las especies interferentes son casi invariablemente excesivas. El comportamiento asintótico es el más típico en este sistema. A continuación se detallan las causas de la curvatura en la calibración por atomización con horno de grafito más significativas.

## a) Factores químicos<sup>34</sup>

Los equilibrios de disociación entre los elementos y sus compuestos deben ser considerados. Estos determinan la fracción del analito disponible como átomos libres para la absorción atómica y son a la vez relevantes tanto para la sensitividad como para el estudio de los errores sistemáticos en el método. El comportamiento termoquímico de la muestra afecta la altura de la señal de absorbancia atómica así como la forma de la misma.

El desarrollo adecuado de un programa de temperaturas para el horno es la primera tarea a realizar cuando se desarrolla un procedimiento de medición por absorción atómica termoeléctrica. La selección de las temperaturas en los diferentes pasos y el dominio de todos los tipos de efectos termoquímicos son los aspectos más importantes para minimizar la influencia de la matriz sin causar pérdidas en el analito.

En el caso de los especímenes biológicos, los residuos de materia sin calcinar pueden resultar más probables. Cuando el oxígeno del medio se agota rápidamente, la combustión de la materia orgánica es incompleta. Asimismo, pueden prevalecer sales y compuestos inorgánicos de alto punto de fusión. Es casi de común acuerdo que la corrección de fondo resulta prácticamente obligatoria, sin embargo es más recomendado el uso del efecto Zeeman antes que la lámpara de deuterio.



Los ácidos presentes en la solución y componentes de la matriz de la muestra, normalmente son removidos durante las etapas de secado y calcinación. No obstante, algunos residuos pueden estar presentes durante la medición, produciendo una absorción no atómica y en general una serie de interferencias indeseables.

Los ácidos con alto punto de ebullición, tales como el HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, originan especies moleculares o radicales como el OH $\bullet$ , ClO $\bullet$ , SO $\bullet$ , SO $_2\bullet$  o el PO $\bullet$ . Ácidos como el HNO $_3$  pueden descomponer térmicamente en NO<sub>2</sub>, o bien en N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y este a su vez en NO, y cuando interactúa con el carbono de la cámara de grafito puede producir radicales CN•. Estas especies, pueden ocasionar a la vez, bandas de absorción no atómica en el momento de la lectura. Sumado a esto, y con efectos más críticos, los óxidos de los mismos analitos o de otros compuestos presentes en la muestra, por ejemplo MgO, ZnO y el Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, tienden a generarse por la disociación térmica de sus sales. Estas fracciones de óxido no disociado representan una pérdida en la absorción atómica a la vez que pueden incrementar la absorción no atómica. Estos efectos pueden ser evitados utilizando una plataforma pirolítica, lo cual facilita concentrar el analito en la zona más caliente de la cámara. Cuando tales efectos ocurren, especialmente con matrices complejas de muestras reales, por ejemplo los residuos guímicos de los solventes o de los óxidos metálicos, una corrección de fondo con lámpara de deuterio (D<sub>2</sub>) conlleva a errores sistemáticos, los cuales no pueden ser corregidos por calibración con adición de estándar. Más aún, la densidad radiante de las lámparas D<sub>2</sub> en una gran parte del espectro es sumamente baja. Por tanto, el procedimiento limita el número de líneas atómicas que pueden ser utilizadas y los elementos que pueden ser determinados. Como la radiación espectral de la lámpara D<sub>2</sub> es generalmente baja comparada con las lámparas de cátodo hueco, estas últimas deben ser operadas con baja corriente, lo cual significa con frecuencia límites de detección poco favorables. El uso simultáneo de dos lámparas,  $D_2$  y cátodo hueco, dificulta el alineamiento de la cámara de grafito y en último caso originar errores sistemáticos más severos.

La termoquímica de los elementos es particularmente importante cuando se logra una destrucción fiable de la matriz sin el riesgo de pérdida del analito. Algunos reactivos termoquímicos como las sales de amonio cuaternario ( $R_4N^+Cl^-$ ), permiten que las muestras orgánicas sean mineralizadas a bajas temperaturas (por debajo de los 400°C) y previenen pérdidas del elementos volátiles. Esto puede ser útil en el caso del cadmio y el zinc, que forman compuestos organometálicos en muchas matrices orgánicas. Estas sales remueven también el cloruro de sodio, presente en la mayoría de los especímenes biológicos. El nitrato de amonio reacciona con el cloruro de sodio produciendo nitrato sódico, el cual descompone a una temperatura mucho menor, y el cloruro de amonio que sublima alrededor de los 350°C. La volatilización del cloruro de sodio sólo es posible por encima de los 1400°C.

Existen protocolos bien establecidos que deben ser seguidos para suprimir interferencias químicas. Ciertas sales minerales o reactivos orgánicos se agregan a las soluciones de las muestras como agentes "liberadores" para efectos correctivos. Estos tratamientos efectivamente liberarán al analito de compuestos desfavorables que se pueden formar durante el proceso para formar otros que mejoren la eficiencia del sistema.



Para prevenir o disminuir las interferencias químicas y de matriz, en los sistemas de horno de grafito se utilizan además otros modificadores químicos como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para formar complejos con iones divalentes. La adición de nitrato de magnesio o sales de paladio son eficaces para lograr una población de átomos libres de efectos de matriz. Los mecanismos envueltos en la aplicación de modificadores químicos relacionan también efectos sobre la superficie del horno y son en sí mismos un campo específico de investigación.

Algunos elementos tienden a formar carburos térmicamente estables, dando lugar a pérdidas en la señal atómica. El uso de tubos de grafito con recubrimiento pirolítico es conveniente en este sentido. Alternativamente, el uso del nitrógeno puede tener un efecto similar, formando nitruros que son más fáciles de disociar.

Cuando muchas de las interferencias antes mencionadas causan un cambio definido sobre la pendiente del gráfico de calibración se recomienda calibrar por adición de estándar.

#### b) Factores físicos

El diseño del espectrofotómetro juega un rol importante en la forma del gráfico de calibración. Los parámetros a tomar en cuenta al respecto pueden ser resumidos en:

#### b.1 Resolución del monocromador

La función del monocromador es permitir la entrada al detector (en este caso un tubo fotomultiplicador) la cantidad de luz más ajustada a la línea de emisión. Al mismo tiempo éste debe excluir líneas de emisiones no resonantes o extrañas. Esa habilidad del monocromador para discriminar determinadas longitudes de onda se denomina "resolución". El diseño del monocromador para lograr una buena resolución debe considerar el intervalo de longitud precisa, el número de líneas en la rejilla de difracción y la medida de las rendijas de salida. Estos factores son interrelacionados y no pueden ser considerados separadamente.

Para muchos elementos, la línea de mayor resonancia dista lo suficiente de las líneas de no resonancia y las líneas de emisión del gas de relleno de las lámparas de cátodo hueco. Solamente una línea de emisión pasa a través de la rendija de salida del monocromador. Si más de una línea logra salir entonces el gráfico de calibración tiende a ser curvilíneo, a menos que todas las líneas salientes tengan exactamente la misma línea de absorción.

Las líneas de emisión que están demasiado cerca de la línea de resonancia como para ser resueltas pueden presentarse de dos maneras:

## b.1.1 Multipletes sin resolver

Muchos elementos de transición, tales como el vanadio y el manganeso, tienen líneas de resonancia que son parte de un multiplete. Por ejemplo, el manganeso exhibe un triplete con líneas en 279,5 nm, 279,8 nm y 280,1 nm. La línea en 279,5 nm absorbe más fuertemente que las otras dos. Un ancho de rendija de 1,0 nm permitiría la entrada de las tres líneas al fotomultiplicador, y por consecuencia el gráfico de calibración irá curvándose a medida incrementa la concentración del analito. Un ancho más reducido, por ejemplo de 0,2 nm, excluiría la mayor parte de la emisión del



conjunto de líneas, generando un gráfico relativamente rectilíneo. En teoría, a medida que el paso de la rendija se reduce, la cantidad de luz no absorbida disminuye y por consecuencia el asintotismo en el gráfico de calibración.

## b.1.2 Líneas no absorbidas

Elementos como el hierro y el níquel, poseen líneas no resonantes muy cerca de los haces de resonancia más sensitivas. Claramente la cantidad de luz absorbida no es proporcional a la concentración atómica. Esto es especialmente obvio en altas concentraciones donde la intensidad de la emisión de resonancia es pequeña comparada con la intensidad de la línea no absorbida. El efecto es una gráfica de calibración con pronunciada curvatura. Reduciendo el ancho de entrada del monocromador se bloquea más de la luz de la línea no resonante y el gráfico tiende a ser rectilíneo. Reduciendo el ancho de las rejillas de salida también se logra un efecto similar. Esta reducción también disminuye la cantidad de luz del haz resonante. Esta reducción en la luz usualmente significa un incremento en el ruido de la línea base. El ancho de la rendija entonces obliga a sopesar entre la curvatura del gráfico y el ruido.

Un efecto relacionado a estos fenómenos es la luz extraña, causada por reflexiones aleatorias dentro del monocromador a través del paso por las rendijas de salida. La capacidad de disminuir este efecto marca un parámetro de calidad en el diseño de los monocromadores. Una causa muy previsible de la luz extraña es la incandescencia del horno de grafito. El tubo de partición puede provocar interferencias por emisiones de luz de sus paredes cuando es sometido al paso de la corriente eléctrica. De manera que también el horno debe ser alineado apropiadamente para minimizar este efecto.

#### b.2 Fenómenos ópticos en el atomizador

El paso óptico del espectrofotómetro tiene un punto focal en el atomizador. Una parte del haz puede pasar a través del centro del tubo de grafito y el resto cruzar el mismo formando diferentes ángulos. El efecto más común es la diferencia de longitudes en estas proyecciones. El diseño del espectrofotómetro busca minimizar estos fenómenos, con un sistema óptico de haz estrecho, ajustándose en la medida de lo posible a un paso ideal (el 100% del haz cruzando paralelamente el tubo), esto reduce las variaciones en el coeficiente de absorción y la incandescencia producida en el horno de grafito a altas temperaturas.

#### b.3 Distribución térmica de la nube atómica

La distribución térmica de la nube atómica debe ser tomada en cuenta en la evaluación de los ajustes de calibración. El tubo de grafito puede tener una variación de temperatura significativa. El fabricante debe diseñar cuidadosamente el tubo de manera que pueda asegurar la distribución más constante de la temperatura a lo largo del mismo. Con el uso de hornos isotérmico la mayoría de los átomos tiende entonces a acumularse en las regiones más calientes, en tanto que los extremos más fríos la población atómica tiende a disminuir. Otra herramienta útil en este sentido es la plataforma pirolítica. La plataforma es introducida en el tubo de grafito longitudinalmente. El analito no recibe el calor transmitido desde las paredes del tubo directamente, sino a través de la fase gaseosa de manera más uniforme. Ambas medidas son particularmente útiles en el caso de mediciones directas en muestras sólidas, así como para muestras biológicas, donde los residuos de



materia orgánica pueden permanecer después de la etapa de calcinación y formar dobles picos o señales deformes.

Por medio de estas medidas la distribución térmica de la población de átomos no contribuye significativamente a la curvatura del gráfico de calibración, sino más bien a la reducción de la pendiente de la misma. El uso de hornos isotérmicos, también pueden minimizar la influencia de componentes concomitantes en la matriz del analito sobre la volatilización de la muestra.

## b.4 Distribución espacial de la nube atómica

En el horno de grafito se dispensa una alícuota de la solución el punto medio del mismo. La solución tiende a esparcirse a lo largo de la pared inferior hacia los anillos de partición o en dado caso sobre una plataforma pirolítica. Es razonable asumir que cuando los átomos son vaporizados la nube atómica que trasciende se difundirá hacia arriba y luego hacia los extremos, hasta que la distribución de los átomos se mantiene en un estado más o menos homogéneo (dependiendo del elemento). El pico de la densidad atómica durante la atomización puede contribuir a la no linealidad de la curva de calibración. Deber ser considerado entonces la posibilidad de que el haz de luz pase a través de una distribución insuficientemente homogénea. Esta falla en la uniformidad influye significativamente en la curvatura del gráfico de calibración.

Otro causante de desproporción en la distribución espacial de los átomos radica en propiedades físicas de la matriz. Diferencias en la viscosidad y tensión superficial dan lugar a diferencias en la adhesión y difusión de la muestra por las paredes internas del horno de grafito. El primer efecto, la poca adhesión, puede ser suprimido por adición de surfactantes a la muestra en solución, tales como el Tritón X. El segundo efecto puede ser evitado utilizando tubos de grafito con recubrimiento pirolítico, donde la difusión del analito en el tubo de grafito es baja. Esta medida es efectiva a la vez para prevenir la formación de carburos indeseables.

La distribución espacial de los átomos es el factor físico más influyente en la curvatura de los gráficos de calibración obtenidos en la espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica.

## c) Características espectrales

Una de las mejores condiciones para la absorción atómica es cuando la línea de emisión tiene un rango de longitud de onda más reducido que la línea de absorción. En teoría, una línea de emisión infinitamente estrecha incrementaría la tendencia rectilínea de los gráficos de calibración; en la práctica, se obtienen buenos resultados cuando se mantiene en la mayor medida posible esta relación, siempre que la línea de absorción no cambie a medida incrementa la concentración del analito.

## c.1 Perfil de absorción atómica

En los atomizadores comerciales, los átomos son producidos en condiciones de presión atmosférica. Los átomos y otras especies existentes en el medio dentro de la cámara colisionan continuamente unos contra otros. El perfil de absorción atómica es ensanchado por tales condiciones. Por otra parte, la población atómica se produce en altas temperaturas, aproximadamente entre los 1000K y los 3000K. La velocidad de los átomos en estas condiciones es



sumamente alta. Las líneas de absorción tienen entonces otra fuente de ensanchamiento, causada por el movimiento de los átomos. La lámpara de cátodo hueco está diseñada para emitir luz proveniente de átomos a bajas temperaturas y una presión más bajas que los átomos absorbentes en la cámara de atomización. Las líneas de emisión son entonces más estrechas como las líneas de absorción.

Cuando se opera la lámpara de cátodo hueco con una corriente más alta que la recomendada, puede ocurrir un ensanchamiento en las líneas de absorción. En este caso, el chisporroteo dentro de la lámpara se incrementa generando una nube atómica más densa. Esos átomos interactúan entre sí, causando una mayor presión. La nube tiende a propagarse y enfriarse en los contornos. Una proporción desconocida de los átomos en la zona más caliente, es excitada térmicamente, emitiendo fotones con una cantidad de energía que los átomos en estado fundamental de la región más fría de la nube pueden absorber. Entre mayor sea este efecto la sensitividad será más pobre y la línea de calibración más curvada. Para minimizar el error en la medición, generalmente el voltaje de la lámpara es pulsado, lo cual permite la diferenciación entre la señal de emisión, que es constante, y la señal pulsada de absorción. Esto también sirve para estimar las variaciones instrumentales. En todo caso, el usuario debe observar las especificaciones de voltaje para la lámpara que opera. Naturalmente la vida útil de la misma debe ser tomada en cuenta.

No es del todo imposible la superposición de la línea de absorción escogida para la medición y otra proveniente de una línea secundaria producida por otro elemento. Estas confusiones son inusuales pero a veces es recomendable tomar una segunda medición en otra longitud de onda.

#### c.2 Estructura hiperfina

Se ha asumido el perfil de la línea de emisión como una línea simple y en caso que el supuesto no se cumpla, los multipletes pueden ser normalmente resueltos por el monocromador. Sin embargo, puede ocurrir más bien un proceso de fraccionamiento de un singulete. Este fraccionamiento es causado por interacciones entre el núcleo y los electrones del átomo, debido a un *spin* nuclear o a una mezcla de isótopos. En algunos casos puede deberse a los dos fenómenos. El mercurio a 253,7 nm y el plomo a 283,3 nm pueden sufrir esta división subatómica de la línea de emisión. Las interacciones crean un número de transiciones con muy similar pero distintas variaciones energéticas, de manera que la línea de emisión consiste realmente de un número de líneas muy juntas entre sí. A esto se le conoce como estructura hiperfina. La diferencia en las longitudes de onda de cada una es tan pequeña que el monocromador es incapaz de resolverlas. La línea de emisión es en efecto ensanchada y ello contribuye a la curvatura. Sumado a esto, cada componente de la estructura no posee necesariamente el mismo coeficiente de absorción y esto contribuye aún más a la tendencia curvilínea. Cuando existen otras formas de fraccionamiento de las líneas de emisión, como las líneas atómicas ordinarias o las cuasi-ordinarias, la estructura hiperfina no es tan influyente en la curvatura, pero si contribuye al ensanchamiento de la señal de absorción atómica.

#### c.3 Efecto Zeeman

Cuando se utiliza el efecto Zeeman como corrección de fondo, se da un tipo de curvatura peculiar en los gráficos de calibración, la curvatura reflejo o roll over. Este es un efecto complejo que no se explica satisfactoriamente en unas cuantas líneas.



En el campo magnético, una emisión o absorción atómica es fraccionada en un número de multipletes Zeeman. Normalmente, un singulete se fracciona en tres componentes. El componente central ( $\pi$ ) se tiene la longitud de onda original, las dos fracciones laterales ( $\sigma$ ) son sistemáticamente desplazados simétricamente alrededor del componente  $\pi$ . La intensidad total de las tres fracciones es igual a la de la línea original. El componente  $\pi$  es polarizado paralelamente al campo magnético aplicado, mientras las fracciones o son polarizadas perpendicularmente. Se mide la absorbancia en dos condiciones, cuando la fuerza magnética es cero y entonces se obtiene una medición tanto atómica con de la señal de fondo, y a una fuerza magnética máxima, donde ocurre el fraccionamiento y únicamente se mide la señal de fondo. La suposición de que la absorbancia atómica es cero cuando se aplica la fuerza magnética no es válida en todos los casos. Los componentes  $\sigma$  pueden no estar suficientemente desplazados; de hecho, estos componentes siempre se ensanchan a medida que incrementa la concentración. Estas fracciones tienden a traslaparse en proporción a la concentración. La absorción residual incrementa y esto conlleva a un aumento de la curvatura. Tanto la absorbancia cero como la absorbancia a fuerza máxima tienen una tendencia asintótica, pero esta última desarrolla tal comportamiento con menos sensitividad que la primera y por consecuencia el gráfico resulta parabólico (curvatura reflejo).

El espectrofotómetro del Laboratorio Químico Toxicológico no cuenta con este sistema de corrección, por lo que no se considera para el presente estudio.

Algunas causas que contribuyen a la tendencia curvilínea de los gráficos de calibración y las estrategias corregirlas, se resumen en la siguiente tabla

Causa	Grado de influencia	Acciones correctivas recomendadas	
Interferencias químicas	Grande (elementos del grupo II y refractarios)	Modificadores químicos Uso de plataforma pirolítica	
Multipletes sin resolver	Moderado (elementos de transición)	Disminución de ancho de ranura en el monocromador	
Luz extraña	Grande	Alineamiento apropiado del horno	
Perfil de línea de emisión	Moderado	Corriente apropiada para lámpara de cátodo hueco (amperaje)	
Estructura hiperfina	Moderado	Uso de línea espectral alternativa (longitud de onda)	
Distribución espacial atómica	Moderado	Uso de plataforma pirolítica en algunos casos	

Fabla 4 Causas de curvatura e	n los gráficos de calibración	y posibles acciones correctivas
-------------------------------	-------------------------------	---------------------------------



## 2.8.3. Pretratamiento de la muestra <sup>35</sup>

En la experiencia del Laboratorio Químico Toxicológico, la inyección directa de muestras, sangre o contenido gástrico, producen resultados totalmente desfavorables. La generación de humo es excesiva y simplemente no se logran parámetros de desempeño aceptables. Es indudable la necesidad un pretratamiento de las muestras para proceder a la medición en las condiciones del Laboratorio. Es posible lograr mediciones directas de aluminio en suero y orina, utilizando una plataforma pirolítica previamente tratada con rutenio como modificador químico<sup>36</sup>. Naturalmente, esta metodología se encuentra en la actualidad fuera del alcance del Laboratorio Químico Toxicológico.

En la sección 2.3 se mencionaron otros procedimientos para la medición de aluminio en sangre, la mayoría de ellos consisten en diluciones simples. Se describió un pretratamiento consistente en la disolución de la sangre con una mezcla de hidróxido de amonio y ácido sulfúrico para minimizar los efectos de matriz, pero en el mismo estudio se reconoce que el buen rendimiento únicamente fue comprobado en concentraciones de aluminio por debajo de los 10  $\mu$ g/L, estos es a niveles fisiológicos normales; aún más relevante es que, según los autores, el desarrollo del programa del horno no fue tan satisfactorio. El uso del ácido cítrico y sus sales aparece como una opción factible y razonable, sabiendo de sus propiedades, ya antes descritas (2.6.2 y 2.6.3). Los métodos que refieren la adición de citratos no se encontraron con muchos detalles, pero han sido propicios como punto de partida para el diseño de procedimientos de pretratamiento. Otros estudios en sangre refieren resultados adecuados con la medición del sobrenadante, luego de la precipitación de proteínas por un pretratamiento con ácido nítrico concentrado<sup>37</sup>. En general, pueden considerarse métodos de dilución simple o con algunos coadyuvantes como un surfactante o un estabilizador por ejemplo, cuando se ha comprobado que los efectos sobre la medición son controlables y aseguran la fiabilidad de los resultados. La dilución simple como pretratamiento es la que introduce menos ruido en los procesos analíticos, luego de la medición directa de las muestras, siempre que se mantenga una relación razonable entre la concentración original y la diluida.

Las técnicas y métodos de pretratamiento de muestras para el análisis de metales pueden aplicarse con diversos objetivos, por ejemplo: degradar o solubilizar las matrices para liberar los analitos; extraer los metales de la matriz en un solvente más adecuado para el método de medición; concentrar metales en muy bajas concentraciones; diluir un analito en muy altas concentraciones; separar una especie del analito del resto, cuando las demás pueden interferir.

La formación de pastas es otro método útil. Esto es factible cuando la muestra puede ser pulverizada finamente y suspenderse para formar una pasta fluida, dando resultados aceptables.

Un resultado esperado en la mayoría de las situaciones, es obtener una solución clara. Los métodos de digestión deben ser seleccionados según el tipo de muestra, los metales a ser determinados y el método de ensayo que será utilizado. Los métodos más comunes son la digestión húmeda con soluciones ácidas, la calcinación y la extracción sin destrucción total de la matriz. Cuando se trata de medición de trazas, se debe prevenir error por contaminación de los reactivos y los recipientes utilizados. Sumado a esto, existe también la posibilidad de pérdidas del analito durante el proceso. Las superficies de vidrio pueden de adsorber iones metálicos. Los materiales de vidrio son los

menos apropiados para el pretratamiento de muestras en los análisis de metales. Otro riesgo es la volatilización de algunos metales, esto no es el caso del aluminio.

La digestión ácida es apropiada cuando se destina la muestra a la determinación del analito total, ya que el método es destructivo y acaba con cualquier información sobre la especiación del metal en la muestra original. El método común es disolver la muestra en un recipiente abierto, aunque también puede efectuarse una digestión presurizada en contenedores sellados y con descomposición asistida por microondas. Las muestras son usualmente preparadas por digestión con ácidos fuertes. En el caso de matrices biológicas, se utiliza comúnmente una mezcla oxidante para destruir toda la materia orgánica. El resultado es generalmente una solución translúcida. El ácido nítrico es uno de los más comunes para estos efectos, debido a que no forma sales insolubles, lo que podría ocurrir con el HCl o el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El peróxido de hidrógeno puede ser adicionado para incrementar el poder oxidante de la solución. La escogencia del ácido depende de la muestra. Productos inorgánicos solubles, sales, metales activos o electropositivos pueden ser disueltos en agua o ácidos diluidos. El aluminio metálico puede necesitar trazas de cloruro mercúrico para prevenir la formación del óxido en ácidos diluidos. Se prefieren soluciones de concentración intermedia de ácidos que estos altamente concentrados. En este último caso, el digestor puede atacar el recipiente y generalmente requiere mayor cuidado en el laboratorio. El ácido nítrico oxida la muestra y podría ser adicionado antes que un oxidante fuerte, como el HClO<sub>4</sub>, para remover la mayor parte de los materiales oxidados. Siempre se adicionan los agentes más débiles y por último los más agresivos. El ácido nítrico es recomendable para muestras insolubles.

Cuando el ácido nítrico no es suficiente, puede emplearse una mezcla de este con ácido clorhídrico en proporción 1:1; si aún así la digestión no es satisfactoria, entonces se recurre a un tratamiento más fuerte como una mezcla 2:1 de ácido sulfúrico y nítrico. Esta mezcla puede desprende un denso vapor fumante de SO<sub>3</sub>; posteriormente, se requerirá enfriar y diluir con agua y volver a calentar para disolver todas las sales. Una opción aún más radical es adicionar a una de las mezclas anteriores una solución 1:1 de ácido nítrico y perclórico, cuando la digestión previa haya culminado y la muestra haya sido enfriada.

La selección del material de los recipientes es crítica para la digestión ácida, especialmente en los procesos más agresivos. Con el vidrio pueden ocurrir dos fenómenos: extracción metales del mismo; y adsorción del analito por procesos quelantes o de intercambio iónico. Para metales propensos a perderse por efecto del vidrio, se recomiendas recipientes de polytetrafluoroetileno (PTFE).

La finalidad de encontrar un método adecuado de pretratamiento es obtener muestras consistentes que permitan resultados precisos y con una recuperación tolerable.

## 2.8.4. Método y modelo de calibración

Calibración es la operación que relaciona una cantidad de salida a una cantidad de entrada, para un determinado sistema de medición en condiciones definidas. En los procesos de mediciones químicas las cantidades de entrada generalmente se trata de cantidades caracterizadas de un analito y las cantidades de salida la respuesta respectiva en un sistema químico o instrumental. En



espectrofotometría de absorción atómica este proceso de calibración puede realizarse por al menos dos formas: caracterizando la señal de respuesta, en este caso expresadas en unidades de absorbancia, con respecto a diferentes niveles de concentración de un patrón de analito, en condiciones similares a la muestra; y caracterizando las señales de respuesta en función de distintos niveles de concentración de analito adicionado a la muestra misma. Esta última se conoce como adición de estándar. La decisión entre una y otra depende habitualmente del grado de efecto de la matriz.

La calibración con patrones permiten varias aproximaciones matemáticas. La aproximación más sencilla es la regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados. Para aceptar esta estimación, deben ser comprobados dos condiciones:

- 1) El error en la variable independiente (cantidad de entrada) es mucho menor que el error en la variable dependiente (cantidad de salida)
- 2) La variabilidad de las respuestas a lo largo del rango de calibración es la misma.

Cuando la condición 1 no se cumple, la aproximación recomendada es la calibración ortogonal. Cuando la condición 2 no se cumple, entonces se recomienda la calibración lineal ponderada.

Estas tres primeras alternativas son originalmente funciones de primer orden, cuando el patrón gráfico de las señales dibuja una línea aproximadamente rectilínea. Como se ha explicado en la sección **2.8.2**, en espectrofotometría de absorción atómica es de esperar patrones curvilíneos. Las aproximaciones de primer orden entonces no resultan satisfactoriamente adecuadas. Los espectrofotómetros, y en particular el spectrAA 200 que posee el Laboratorio Químico Toxicológico, cuentan generalmente con sofwares capaces de calcular funciones polinomiales para realizar aproximaciones más exactas. Los parámetros decisivos para escoger uno u otro son el ajuste y la exactitud del modelo resultante.

El software que controla las actividades del espectrofotómetro que posee el Laboratorio Químico Toxicológico, es el spectrAA v 5.1 (Varian<sup>®</sup>). Este programa cuenta con los siguientes algoritmos:

- a) Lineal: cálculo de regresión lineal simple
- **b)** Origen lineal: cálculo de regresión lineal simple sin intercepto
- c) Cuadrático: cálculo de regresión cuadrática (segundo orden)
- d) Origen cuadrático: cálculo de regresión cuadrática, sin término independiente (intercepto)
- e) Cúbico: cálculo de de regresión cúbica
- f) Origen cúbico: cálculo de regresión cúbica sin término independiente



- g) Racional: ploteo de punto a punto de los niveles de la curva de calibración
- h) Racional nuevo: cálculo de una relación polinomial de calibración inversa, la absorbancia es tratada como variable independiente y la concentración como variable dependiente. El algoritmo resultante consiste en la ración de la absorbancia entre una función de segundo orden de la misma. La función de calibración es igual a la función de análisis.

Esta última aproximación es la más aplicada en los trabajos rutinarios, a pesar de no ser convencional y de hecho inexistente en los ensayos rutinarios de otras técnicas analíticas.

Cuando se evidencia un efecto de matriz en las mediciones, trivialmente se aplica el método de adición de estándar. Éste consiste en adicionar en una razón constante porciones de patrón a diferentes alícuotas de de igual volumen de muestra, y llevadas todas a un mismo volumen. Las características físicas y químicas de todos los niveles son las mismas, excepto la concentración de patrón adicionado. La curva de calibración es la muestra misma en esta situación.

Se ha indicado en todos los textos convencionales que la aproximación matemática apropiada para este método debe restringirse a la regresión lineal simple, quizás en última instancia a otra aproximación que tienda a una gráfica rectilínea. En la práctica, cuando se trabaja con espectrofotometría de absorción atómica, en especial la termoeléctrica y en matrices biológicas, este comportamiento no siempre es posible. Koscielniak demuestra con algoritmos cuadráticos que es posible el cálculo de aproximaciones de segundo orden para adición de estándar<sup>38</sup>. El autor demostró en varios ensayos por espectrofotometría de absorción y emisión atómica de llama que estos algoritmos pueden proporcionar resultados precisos y veraces, de hecho con mayor rendimiento que los algoritmos de primer orden. En síntesis, se calculan los coeficientes de los términos de una ecuación cuadrática. Partiendo de la ecuación para el conjunto solución de fórmulas cuadráticas, se incorpora un valor equivalente al incremento de la cantidad de patrón adicionado y el número de niveles. El cálculo de la concentración del analito queda expresado de la siguiente manera

$$\boldsymbol{C_x} = \frac{\boldsymbol{B_2} - \sqrt{\boldsymbol{B_2}^2 - \boldsymbol{4} \cdot \boldsymbol{B_1} \cdot \boldsymbol{B_3}}}{2 \cdot \boldsymbol{N} \cdot \boldsymbol{B_3}} \cdot \Delta \boldsymbol{C_{aN}}$$



Donde:  $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$ , son los coeficientes de una relación donde  $R = B_1 + nB_2 + n^2B_3$ ; n en este caso es el número de nivel de adición de patrón en la curva (n = 1, 2, 3....N) y R es la respuesta obtenida; N es el número total de niveles con los que se construye la curva y  $C_{aN}$  es la cantidad añadida en el nivel N de adición (último nivel)

Desarrollar y evaluar sistemas de calibración no lineales conlleva algunos desafíos. La mayoría de las guías para la validación de métodos están diseñadas para métodos cuantitativos asumiendo modelos de regresión lineal, en el mejor de los casos se presentan métodos para desarrollar y evaluar el desempeño de modelos ponderados para sistemas heterocedásticos. Para algunos parámetros de desempeño que ocupan la función de calibración, los algoritmos deben ser



modificados, como el caso de los límites de detección y de cuantificación que basan sus ecuaciones en el supuesto de un intercepto y una pendiente únicamente influidos entre sí. La exactitud y la incertidumbre de la curva es también se ven afectadas por el error de un coeficiente extra que se incorpora e interactúa con el resto. En un modelo cuadrático el intercepto influye drásticamente sobre los resultados en la función de análisis. Se han publicado varios trabajos que proponen métodos exitosos determinar estos parámetros con funciones parabólicas de calibración. Steliopoulos y colaboradores presentan un enfoque de la validación de métodos que se basa en un modelo de regresión de segundo grado, en el que dos tipos de errores se han incorporado, esta perspectiva se expone y se aplica a un conjunto de datos experimentales. La guía de validación desarrollada permite la determinación de las características de rendimiento de análisis mencionados en la Decisión 2002/657/CE, es decir, la repetibilidad, la reproducibilidad de laboratorio, el límite de decisión y la capacidad de detección<sup>39</sup>. Van Loco y colaboradores exponen alternativas para estimar el valor mínimo detectable (VMD), que se tratan de modificaciones del procedimiento de la norma ISO 11843-2, para gráficos de calibración curvilínea. En principio, se linealizaron los gráficos y el VMD se evaluó con fórmulas basadas en la estimación de la MDV para calibración lineal. Alternativamente, el mismo parámetro fue determinado por un método basado en los intervalos de confianza para gráfico polinomial de segundo orden.

Dos parámetros que se consideran importantes para la evaluación de la calidad del desempeño de los modelos de calibración lineal son el factor de curvatura (Q) y el coeficiente de la calidad de la curva (QC). El parámetro Q, con una dimensión entre -1 y +1, estima la gradación de la curvatura en la línea de calibración (**Ecuación 21**). Este parámetro es de especial importancia para valorar la precisión de la calibración no lineal. Se observa cuando del valor de Q disminuye la desviación estándar aumenta progresivamente. Esta tendencia es especialmente acusada cuando Q < 0, es decir, cuando la línea de calibración se hace cóncava hacia el eje de concentración. Por otro lado, aparece la posibilidad de reducir el error aleatorio con el aumento de la curvatura convexa de la línea de calibración, es decir, cuando se incrementa el valor positivo del parámetro Q, siempre que el análisis se realice en condiciones que permitan la línea de calibración explícitamente convexa.

$$\mathbf{Q} = \frac{2 \cdot \mathbf{\hat{R}_N} / 2 - \mathbf{\hat{R}_N} - \mathbf{\hat{R}_0}}{\mathbf{\hat{R}_N} - \mathbf{\hat{R}_0}}$$
 Donde R es la predicción del modelo para el nivel 0, N y N/2

Ecuación 21

El factor recomendado a menudo con el fin de estimar la bondad del ajuste del modelo de calibración es el coeficiente de calidad de la curva (QC). Para modelos cuadráticos se puede calcular con la **Ecuación 22** 

$$%\mathbf{QC} = \left[\frac{\sum_{m=1}^{M} \sum_{n=0}^{N} \left(\frac{(\mathbf{R}_{n})_{m} - \hat{\mathbf{R}}_{n}}{(\mathbf{R}_{n})_{m}}\right)^{2}}{\mathbf{M}(\mathbf{N}+1) - 3}\right]^{1/2} \cdot 100$$

Ecuación 22



Vankeerberghen y Smeyers-Verbeke<sup>40</sup> propuso este parámetro en el desarrollo de sistemáticas de decisión de la calidad de los datos en la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Planteó un coeficiente de calidad (QC), como una prueba de la calidad de las calibraciones. La filosofía en su sistema es que la línea de calibración con una QC por debajo de un cierto umbral predefinido por el usuario podría considerarse "buena", siendo tratada con el método usual de mínimos cuadrados, mientras que la línea con una QC que sobrepasa el límite deberían ser investigada por los errores que podrían afectar el ajuste (errores de modelo, valores atípicos, etc). Una aproximación que se supone que aceptable en un caso concreto es un %QC  $\leq$  5%. Este parámetro asume previamente que la desviación estándar se mantiene a lo largo del rango de calibración.

En espectrofotometría de absorción atómica la tendencia de la señal en función de la concentración no es típicamente parabólica sino asintótica, es decir que la variabilidad se reduce constantemente pero no es igual a cero, así tampoco la pendiente invierte su signo, exceptuando algunos casos; sin embargo este fenómeno de "saturación de la señal" puede ser aproximado por modelos cuadráticos apropiadamente. Como se ha expuesto anteriormente, existen suficientes estudios que caracterizan las funciones de calibración cuadráticas para presentar un trabajo de validación utilizando un método de regresión polinomial de segundo orden. Como el comportamiento del sistema no es precisamente parabólico, generalmente no manifiesta un punto de inflexión y por ello las curvas de calibración deben ser limitadas en el rango de concentración donde estas aproximaciones tienen concordancia con el modelo físico de la medición.



# **3. FACTIBILIDAD**

Se especificaron las condiciones de trabajo para el desarrollo del estudio. Estas especificaciones se detallan en la sección **4.1**. Los requisitos técnicos especificados se ajustan a los recursos existentes en el Laboratorio Químico Toxicológico. De hecho se aprovecharon recursos sin utilizar (en bodega) dentro del laboratorio, lo que favoreció a la reducción del desperdicio y los costos de baja calidad.

La demanda ordinaria de insumos del Laboratorio Químico Toxicológico no fue incrementada significativamente. La metodología desarrollada se basó en el microanálisis, utilizando volúmenes reducidos de solventes, reactivos y estándares.

Para la realización del trabajo se estiman el consumo de los siguientes insumos

Insumo	Cantidad (unidades)	Precio unitario	Precio total					
Lámpara de cátodo hueco de aluminio (Parte 5610100100)	1	\$250,00	\$250,00					
Nitrógeno grado UHP*	3	\$100,00	\$300,00					
Solución de nitrato de magnesio AA 1 g/L (250 ml)	1	\$ 60,00	\$60,00					
Solución de referencia de aluminio AA 1 g/L (500 mL)	1	\$80,00	\$80,00					
		Total (1 5 años)	\$ 690.00					

#### Tabla 5. Insumos solicitados específicamente para el estudio de desarrollo y validación

\*Se estiman recargas extras por consumo en experimentos de desarrollo y validación durante 1,5 años

El consumo de ácido nítrico ultratrazas fue menor a 250 mL a lo largo de toda la investigación. En tanto que el consumo de solución de referencia y de modificador fueron menores a los 500 mL y 250 mL respectivamente.

Respaldado por los insumos rutinarios disponibles y los insumos sin movimiento (almacenados) en el Laboratorio Químico Toxicológico la realización del proyecto es sostenible sin la implicación de una sobrecarga presupuestaria para la organización.

# 4. METODOLOGÍA

## 4.1. Requerimientos técnicos

- **4.1.1.** La metodología desarrollada debe recoger los siguientes elementos de entrada:
  - a) Requisitos técnicos y funcionales
  - b) Requisitos legales y reglamentarios
  - c) Requisitos externos o de otras partes involucradas

## 4.1.2. Personal

El responsable para el proyecto de diseño y desarrollo del presente método debe estar calificado sobre la base de una educación, una formación, una experiencia apropiadas y de habilidades demostradas<sup>41</sup>. Para ello, se debe tener un dominio satisfactorio de la Espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, de principios de aseguramiento y control de calidad en laboratorios de ensayo, del manejo de muestras biológicas, así como de la toxicología del fosfuro de aluminio.

## 4.1.3. Instalaciones y condiciones ambientales

- **4.1.3.1.** Debe destinarse un área exclusiva para los trabajos de preparación de muestras y reactivos, para evitar cualquier contaminación cruzada
- **4.1.3.2.** Todas las áreas de preparación de muestras deben estar separadas del área de instrumentación.
- **4.1.3.3.** las instalaciones donde se realicen los trabajos deben poseer área limpias para el desarrollo de los mismos, y asegurar un riesgo mínimo de contaminación de las muestras
- **4.1.3.4.** Antes de llevar a cabo los experimentos debe efectuarse una limpieza meticulosa del área de trabajo, primeramente con limpiones húmedos, seguido de papel absorbente desechable y luego con papel absorbente de fibra de vidrio u otro material que deje la menor cantidad de residuos posibles. Se debe limpiar la superficie del área de trabajo con agua destilada.
- **4.1.3.5.** Se debe trabajar en ambiente climatizado a temperaturas menores a los 25°C, para evitar la degradación de los especímenes biológicos y minimizar la reactividad de los productos químicos utilizados
- **4.1.3.6.** El rango de temperatura especificada para el área instrumental es entre 10°C y 25°C, y el rango de humedad relativa especificado es de 8% al 80% sin condensación, de acuerdo a



la altitud de la zona geográfica donde se encuentra el Laboratorio (aproximadamente 1000 msnm)^{42\,43}

- **4.1.3.7.** El atomizador de tubo de grafito requiere voltajes de 208 V, 220 V, ó 240 V AC  $\pm$  10%.  $^{42\,43}$
- **4.1.3.8.** En vista que no puede evitarse la difusión de partículas suspendidas en el área de trabajo, los materiales volumétricos y demás recipientes para muestras y materiales químicos deben ser expuestos lo menos posible al ambiente. Los materiales son almacenados permanentemente en contenedores plásticos cerrados mientras no se usan.
- **4.1.3.9.** Las condiciones ambientales deben ser evaluadas. La validación del método debe demostrar que las condiciones ambientales asequibles por el Laboratorio Químico Toxicológico no invalidan ni comprometen los resultados, de acuerdo al propósito para el que la metodología es diseñada (**1.1**).

## 4.1.4. Equipo

El equipo básico con el que se parte para los experimentos de desarrollo son los siguientes:

## 4.1.4.1. Equipos instrumentales e insumos de operación

- a) Espectrofotómetro de absorción atómica, marca Varian<sup>®</sup>, modelo SpectrAA 200
- b) Atomizador de horno de grafito, marca Varian<sup>®</sup>, modelo GTA 100
- c) Lámpara de cátodo hueco de aluminio, marca Varian®
- d) Lámpara de deuterio, marca Varian®
- e) Automuestreador (PSD), carrusel portamuestras con su cobertor
- f) Tubo de grafito, particionado, con recubrimiento pirolítico
- g) Nitrógeno grado UHP, pureza 99,999%
- h) Suministro de agua por sistema de bombeo
- i) Bomba mecánica, 5 caballos de fuerza
- j) Centrífuga, marca Abbot
- **k)** Vórtex, modelo Genier, marca Fisher

#### 4.1.4.2. Insumos y materiales

- a) Papel parafinado
- **b)** Frascos de polietileno de distintos volúmenes
- c) Viales polipropileno, de fondo cónico, de aproximadamente 2 mL
- d) Viales de vidrio, de 25 mL, para carrusel

#### 4.1.4.3. Materiales volumétricos

- a) Micropipeta con capacidad para transferir (10 100) µL, marca Eppendorf
- b) Pipeta volumétrica serológica de 1 mL de capacidad, clase A
- c) Perilla de hule para pipetas



- d) Seis Matraces volumétricos de vidrio de 5 mL de capacidad, clase A, marca Pyrex®
- e) Matraz volumétrico de 10 mL de capacidad, marca Kimax<sup>®</sup>, clase A, certificado con tolerancia ±0,02 mL
- f) Matraz volumétrico de 25 mL de capacidad, clase A, marca Pyrex®
- g) Beacker de polietileno, con capacidad para 1000 mL, destinado a la preparación de soluciones de ácido nítrico ultratrazas
- h) Beacker de polietileno, con capacidad para 50 mL, destinado a contener y transvasar ácido nítrico ultratrazas
- i) Beacker de polietileno, con capacidad para 1000 mL, destinado a la preparación de soluciones reactivas y de limpieza
- j) Beacker de polietileno, con capacidad para 250 mL, destinado a la preparación de soluciones reactivas y de limpieza
- k) Beacker de polietileno, con capacidad para 1000 mL, destinado a contener y transferir agua destilada y desionizada
- I) Pizeta de polietileno
- m) Gotero de polietileno, de aproximadamente 2 mL de capacidad
- n) Probeta graduada de polimetilpenteno (PMP), de 100 mL de capacidad, clase B, marca Nalgene®
- o) Probeta graduada de polimetilpenteno (PMP), de 10 mL de capacidad, clase B, marca Nalgene®

#### 4.1.4.4. Solventes y reactivos químicos

- a) Agua destilada y desionizada
- b) Ácido Nítrico >69,0%, grado ultratrazas, TraceSelect, marca Fluka
- **c)** Ácido Clorhídrico ACS
- **d)** EDTA, grado reactivo
- e) Tritón X-100
- f) Solución de EDTA 10% (EDTA y agua destilada y desionizada)
- g) Solución de HNO<sub>3</sub> 50% v/v (ácido nítrico ACS y agua destilada y desionizada en proporción 1:1)
- h) Solución de HNO<sub>3</sub> 1% v/v (ácido nítrico grado ultratrazas y agua destilada y desionizada)
- i) Solución de HCl 1% v/v (ácido clorhídrico grado analítico y agua destilada y desionizada)
- j) Solución de nitrato de magnesio 1 g/L, marca Fluka, grado ultratrazas
- k) Ácido cítrico grado p.a. A.C.S., marca Fisher
- I) Ácido clorhídrico (36,5 38,0)%, grado reactivo, marca Fisher ( $C_{AI} \approx 0,3 \text{ mg/L}$ )

# **4.1.4.5.** Solución de referencia de aluminio, (1,002 ± 0,004 ) g/L en ácido clorhídrico, trazable BAM

**4.1.4.6.** Todos los dispositivos volumétricos son asignados a un uso específico dentro del procedimiento, de manera invariable e intransferible. Por ejemplo un matraz volumétrico se utiliza exclusivamente para la dilución previa de las muestras, un beacker fue destinado sólo para la preparación de soluciones con ácido nítrico ultratrazas y ácido cítrico.



- **4.1.4.7.** Todo el material de vidrio que entre en contacto con las muestras o insumos químicos debe ser prelavado con solución de ácido nítrico al 50%. Los matraces volumétricos deben ser mantenidos permanentemente llenos con ácido nítrico al 50%, y ser lavados con abundante agua desionizada antes de su uso. Cuando se culmina la jornada de trabajo, estos materiales deben ser llenados nuevamente con solución de ácido nítrico al 50%
- **4.1.4.8.** Todo material de polietileno u otro polímero que tenga contacto con las muestras debe ser lavado previamente con solución de EDTA 10% y agua destilada y desionizada
- **4.1.4.9.** Todos los materiales volumétricos deben estar protegidos del polvo y contaminación ambiental, en contenedores de plástico.
- **4.1.4.10.** Para efecto de minimizar los errores sistemáticos, los equipos de medición serán reemplazados únicamente en caso de daños o desperfectos. En tal caso deben aislarse y ser reemplazados.
- 4.1.4.11. Todo equipo que durante el estudio se reemplace o sume a la lista enunciada en4.1.4, debe ser sometido a los procesos de limpieza y mantenimiento descritos en este protocolo de trabajo.
- **4.1.4.12.** Si un material volumétrico calibrado se reemplaza, la calibración debe ser repetida.
- **4.1.4.13.** Debido a que la variabilidad introducida por la calibración de los equipos no es significativa comparada por la variabilidad de condiciones experimentales, en la etapa da desarrollo del método únicamente debe asegurarse que se han seleccionado los materiales adecuados de trabajo, por ejemplo material volumétrico clase A
- **4.1.4.14.** Todos los equipos de medición deben estar calibrados, o su calibración debe ser verificada, antes de la etapa de validación
- **4.1.4.15.** El cabezal del horno de grafito y el alineamiento de las lámparas no deben alterarse una vez que el espectrofotómetro haya sido calibrado
- **4.1.4.16.** Todos los equipos, insumos y materiales en general, deben estar identificados inequívocamente y destinados a un uso específico para evitar errores de contaminación cruzada. Los materiales volumétricos y recipientes no serán permutados o reemplazados sin antes proceder con la limpieza y preparación adecuada.
- **4.1.4.17.** Todos los equipos deben ser operados y recibir el mantenimiento, conforme al procedimiento rutinario del Laboratorio. Antes de la calibración del sistema de espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica y consecuentemente la validación del método, se debe tener un procedimiento de operación y mantenimiento rutinario para el mismo, conforme a las especificaciones y requisitos operativos definidos en los respectivos manuales.



## 4.1.5. Muestreo y manipulación preanalítica

- **4.1.5.1.** Las muestras seleccionadas para el estudio son sangre postmortem total y contenido gástrico
- **4.1.5.2.** El contenido gástrico debe ser recolectado en frascos plásticos estériles para muestras clínicas, en un volumen mínimo de 5 mL
- **4.1.5.3.** Idealmente, las muestras deben ser manipuladas manteniendo una cadena de frío, para evitar la degradación de las mismas.
- **4.1.5.4.** Una vez recibidos los especímenes, se transfieren dos alícuotas de aproximadamente 1,5 mL a los viales cónicos de centrifugación. Cuando es posible, se recolectan más alícuotas; asimismo, en caso de volúmenes pequeños de muestras disponibles, únicamente se extrae una alícuota
- **4.1.5.5.** Cada vial debe ser identificado inequívocamente, y codificado de manera que pueda ser trazado con una matriz de datos sobre la muestra.
- **4.1.5.6.** Esta matriz de datos, contiene información como: número de autopsia u otra identificación de origen, tipo de espécimen, causa de muerte, vía de administración según historia forense, fecha de muerte, fecha de ingreso a Laboratorio Químico Toxicológico, fecha de extracción de muestra para estudio, descripción de contenedor de recolección, volumen almacenado y observaciones
- **4.1.5.7.** Las muestras deben ser almacenadas en congelación, a -20 °C, hasta su análisis
- **4.1.5.8.** Las muestras deben ser descongeladas totalmente y homogenizadas en Vórtex antes su estudio

## 4.1.6. Registros y documentación

Todos los resultados obtenidos deben registrarse, según la actividad en el formulario o libro apropiado:

- a) Actividades de operación y mantenimiento del sistema de espectrofotometría de absorción atómica: bitácora de operación y mantenimiento del espectrofotómetro de absorción atómica y atomizador de tubo de grafito SpectrAA 200 GTA 100
- b) Diseños y condiciones experimentales, resultados, observaciones y conclusiones de los experimentos: bitácora del analista

 c) Condiciones ambientales, limpieza de área de trabajo, temperaturas: bitácora de operación y mantenimiento del espectrofotómetro de absorción atómica y atomizador de tubo de grafito

## 4.2. Procedimiento

## 4.2.1. Identificación de Factores

Basado en la revisión bibliográfica se identificaron por relación de causa-efecto los factores críticos que influyen en la estabilidad de la curva de calibración, definida por su grado de asintotismo o curvatura (Q) y la precisión de las mediciones. Estas características de desempeño tienen un efecto directo sobre la recuperación, al estandarizar las condiciones para asegurar un modelo de calibración química adecuado y la estabilidad en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad del método fue posible resolver el problema de la recuperación y la exactitud en las mediciones. Los diagramas de causa-efecto elaborados se muestran en la **Ilustración 4** e **Ilustración 5** 

De los factores identificados, varios dependen del diseño del instrumento de medición y otros, indefectiblemente forman parte del aseguramiento de la calidad del método. Sin embargo, se identificaron tres factores críticos para ser evaluados experimentalmente

Para el estudio de la curvatura se identificaron los siguientes factores y niveles experimentales

Factor	Nivel 1	Nivel 2
Solvente	Ácido nítrico 1%	Ácido clorhídrico 1%
Modificador químico	Nitrato de magnesio	Cloruro de paladio
Ancho de ranura en rendija de monocromador	0,2 nm	0,5 nm

Como indicador se utilizó el factor de curvatura Q y como criterio de evaluación fue un factor Q cercano a cero como evidencia de una reducción del sintonismo

Para el estudio de la precisión y recuperación se aplicaron las condiciones óptimas encontradas en la primera sub-etapa experimental. Se aplicaron prácticas orientadas a la estabilización del analito:

- El uso de un preservador que estabilice tanto el aluminio poco soluble (hidróxidos y clorohidróxidos) como el aluminio coloidal (polimerizado)
- La homogenización previa de las muestras antes de la extracción de alícuotas
- La centrifugación racional de las alícuotas para eliminar partículas groseras
- La aplicación de buenas prácticas para la preservación de los especímenes biológicos (el uso de viales de polipropileno, sellados, en congelación a -20 °C)

Se identificaron como factores críticos sobre la recuperación y la exactitud el efecto de la dilución y el efecto de la matriz biológica.



Ilustración 4. Diagrama de Ishikawa sobre causas que influyen en la curvatura de la línea de calibración



MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA AL ANÁLISIS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN A TÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO

**Carlos Iván Roque** 



Ilustración 5 Diagrama de Ishikawa sobre causas que influyen en la curvatura de la precisión y recuperación

## 4.2.2. Pruebas de Desarrollo

#### 4.2.2.1. Pruebas experimentales previas

#### Selección de longitud de onda

Se seleccionó entre las opciones provistas por el instrumento dos longitudes de onda recomendadas: 396,2 nm y 309,3 nm. Se evaluó la factibilidad de obtener sistemas calibrados automáticos en ambas longitudes de onda, así como el factor de curvatura y el coeficiente de calidad de la curva de calibrado

#### Rango de trabajo

Se realizaron pruebas con tres conjuntos de calibradores en tres rangos de concentración:

- 1 μg/L 10 μg/L
- 10 μg/L 100 μg/L
- 100 μg/L 1000 μg/L

Cada curva fue elaborada tanto en solución de ácido nítrico 1% como en ácido clorhídrico 1%, con modificador y sin modificador.

Se diseñó una matriz experimental para cada set de calibradores, combinando estos dos factores y sus niveles. Este diseño cumple con el requisito de ortogonalidad. Previamente los factores y sus niveles fueron codificados

Tabla 6. Codigos de factores y hiveles							
FACTORESb0 (intercepto)b1b2							
-1	1	Ácido nítrico 1%	Sin modificador				
1	1	Ácido clorhídrico 1%	Con modificador				

Table C. Cédiana da fastanas univelas

#### Tabla 7. Matriz experimental **EXPERIMENTO** b0 b1 b2 1 1 -1 -1 2 1 -1 1 3 1 1 -1 4 1 1 1

#### Ilustración 6. Ortogonalidad del diseño





Se evaluó la capacidad para lograr sistemas con ajuste aceptable y se seleccionó el rango más apropiado para las concentraciones esperadas en las muestras reales para proseguir con diseños experimentales más detallados.

#### Ancho de ranura en rendija del monocromador

Para seleccionar los niveles del factor de ancho de rendija se evaluó entre las posibilidades que provee el instrumento tres opciones: 0,2 nm, 0,5 nm y 0,5 nmR (El ancho de hendidura 0.5R indica que se reduce la altura de hendidura. Esto es útil para limitar la incandescencia proveniente de las paredes del horno que llega al detector)

La selección se realizó por inspección visual de los espectros de emisión.

#### 4.2.2.2. Optimización del método sobre asintotismo

Con los factores identificados en 4.2.1 se diseñó una matriz experimental en la que las variables experimentales seleccionadas (solvente, modificador y ancho de ranura) se combinaron uniformemente. Este diseño experimental cumple con el requisito de ortogonalidad. Previamente los factores y sus niveles fueron codificados. Los experimentos se efectuaron fortificando alícuotas de igual volumen de una muestra de contenido gástrico, de manera que se obtuvieron una serie de curvas de adición patrón. Los factores seleccionados se prueban entonces interactuando con la matriz biológica.

rubid di codigos de lactores y inveles								
FACTORES	b <sub>0</sub> (intercepto)	b1	b2	b3				
1	1	HNO <sub>3</sub> 1%	MgNO3	0,2 nm				
-1	1	HCI 1%	PdCl <sub>2</sub>	0,5 nm				

Tabla 8 Códigos do factoros y nivelos

EXPERIMENTO	b0	b1	b2	b3	b12	b13	b23
1.5.1	1	1	1	1	1	1	1
1.5.2	1	1	1	-1	1	-1	-1
1.5.3	1	1	-1	1	-1	1	-1
1.5.4	1	1	-1	-1	-1	-1	1
1.5.5	1	-1	1	1	-1	-1	1
1.5.6	1	-1	1	-1	-1	1	-1
1.5.7	1	-1	-1	1	1	-1	-1
1.5.8	1	-1	-1	-1	1	1	1
suma	8	0	0	0	0	0	0

#### Tabla 9. Matriz experimental







## **4.2.2.3.** Evaluación del efecto de matriz

Se prepararon doce sets de mezclas biológicas fortificadas, constituidas por seis pares de especímenes biológicos, y un set de solución acuosa de cloruro de aluminio patrón.

## Preparación de mezclas con matriz (M<sub>i</sub>)

Se seleccionaron seis especímenes de contenido gástrico líquido y con la menor cantidad de partículas groseras posible. Cada muestra fue homogenizada y dividida en dos alícuotas de 400  $\mu$ L cada una. A una alícuota se adicionaron 400  $\mu$ L de agua destilada desionizada, estas mezclas fueron identificadas con la letra mayúscula "O". La segunda alícuota de cada muestra fue fortificada con un número "*n*" de porciones de 100  $\mu$ L de solución patrón y fueron completadas con porciones de "4-*n*" de agua destilada y desionizada, para obtener un volumen equivalente a las muestras sin fortificar, estas alícuotas se identificaron con la letra "F". La **Tabla 10** indica las proporciones para la preparación de las mezclas de matriz.

Código	Volumen de matriz (µL)	Porciones de patrón de referencia (n)	Volumen de patrón de referencia (μL)	Porciones de agua (4-n)	Volumen de agua (μL)
M <sub>1</sub> O	400	0	0	4	400
$M_2O$	400	0	0	4	400
M <sub>3</sub> O	400	0	0	4	400
M <sub>4</sub> O	400	0	0	4	400
M <sub>5</sub> O	400	0	0	4	400
M <sub>6</sub> O	400	0	0	4	400
$M_1F$	400	4	400	0	0
$M_2F$	400	4	400	0	0
M₃F	400	2	200	2	200
$M_4F$	400	2	200	2	200
M₅F	400	1	100	3	300
M <sub>6</sub> F	400	1	100	3	300

#### Tabla 10. Preparación de muestras biológicas para la evaluación de la recuperación del método

A partir de cada una de las mezclas se elaboró una curva de calibración por adición de patrón. Se adicionaron distintas cantidades, en proporción constante, de solución patrón a cuatro alícuotas de igual volumen de matriz, una quinta alícuota se diluyó sin adición de patrón y fue identificada como nivel de adición cero. Todas las mezclas fueron diluidas a un volumen de 5 mL en matraces volumétricos. Los volúmenes para la elaboración de los niveles se exponen en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Treparación de inveles para curvas de adición de parion					
Nivel de adición	0	1	2	3	4
Volumen de matriz (μL)	100	100	100	100	100
Volumen de patrón (µL)	0	50	100	150	200
Volumen de dilución (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Tabla 11. Preparación de niveles para curvas de adición de patrón

De cada nivel de adición se diluyeron 25  $\mu$ L agregando 1,5 mL de solución de HNO<sub>3</sub> 1% y ácido cítrico 1% y seguidamente se realizó la medición espectrofotométrica. La preparación de los niveles de adición de las mezclas se esquematiza en la **Ilustración 8** 





#### Ilustración 8. Esquema de preparación de muestras para curvas de adición patrón

#### Efecto de matriz

Se utilizaron calibradores preparados en soluciones acuosas y calibradores a los que se les adicionó una cantidad constante de una matriz biológica. Se examinó el gráfico de calibración que corresponde al sistema de adición de patrón (AE), elaborado con matriz para determinar si difiere significativamente de la curva de calibración en solución acuosa.

Se realizó el análisis de regresión por un modelo de segundo orden, tanto para las curvas de adición de patrón (AE) como la curva de estándar acuoso (EA). Durante las mediciones se verificó la linealidad de las absorbancias en cada nivel por medio del coeficiente de correlación cuadrática y la inspección visual de la desviación de los puntos con respecto a la línea de regresión. El parámetro de aceptación del coeficiente de correlación fue  $\geq$  0,99



Se realizaron tests para los siguientes supuestos:

- a) Las varianzas residuales de las dos curvas de calibración son homogéneas ante la prueba de F (confianza 95%)
- **b)** La regresión de las mediciones obtenidas por adición estándar (AE) contra las obtenidas con soluciones estándar acuosas (EA) tiene un modelo:

 $A_{AE} = m \cdot A_{EA} + a$ Ecuación 23

Donde: **m** = 1, y **a** = 0, aplicando el test de student (significancia 95%)

Las hipótesis para la pendiente son:

H<sub>0</sub>: m = 1 H<sub>a</sub>: m ≠ 1

El estadístico se define por la

$$t_{exp} = \frac{m-1}{S_m}$$
  
Ecuación 24

Donde **m** es la pendiente calculada; **1** es el valor supuesto de la pendiente y  $S_m$  es el desvío estándar de la pendiente.

El desvío estándar de la pendiente se calcula por la

$$\boldsymbol{S}_{m} = \frac{\boldsymbol{S}_{a/m}}{\sqrt{\boldsymbol{\Sigma} (\boldsymbol{C}_{i} - \bar{\boldsymbol{C}})^{2}}}$$

Ecuación 25

Donde  $S_{a/m}$  es la desviación estándar residual del modelo, que se calcula por la Ecuación 26

$$\mathbf{S}_{a/m} = \sqrt{\frac{\Sigma (\mathbf{A}_i - \hat{\mathbf{A}}_i)^2}{N - 2}}$$

#### Ecuación 26

El valor  $t_{exp}$  se compara con el valor tabulado  $(t_{tab})$ ,  $t_{tab}$  es correspondiente a N – 2 grados de libertad con un nivel de 99% de confianza.


Se calculó también el valor de probabilidad de rechazar una hipótesis nula verdadera (**p**) en MINITAB<sup>®</sup>.

Se admite que la pendiente no difiere estadísticamente de 1 si  $t_{exp} < t_{tab}$  y p > 0,05 (95% de confianza)

Las hipótesis para el intercepto son:

H₀: a = 0 H₀: a ≠ 0

El estadístico se define por la Ecuación 27

$$\mathbf{t}_{exp} = \frac{\mathbf{a} - \mathbf{0}}{\mathbf{S}}$$

# Ecuación 27

Donde **a** es el intercepto calculado; **0** es el valor supuesto del intercepto y  $S_a$  es el desvío estándar del intercepto.

El desvío estándar de intercepto se calcula por la Ecuación 28

$$\mathbf{S}_{a} = \mathbf{S}_{a/m} \cdot \sqrt{\frac{\Sigma \mathbf{c}_{i}^{2}}{\mathbf{N} \cdot \Sigma (\mathbf{c}_{i} - \bar{\mathbf{c}})^{2}}}$$

# Ecuación 28

El valor  $t_{exp}$  se compara con el valor tabulado  $(t_{tab})$ ,  $t_{tab}$  es correspondiente a N - 2 grados de libertad con un nivel de 95% de confianza.

Se evalúa también la falta ajuste del modelo lineal, por medio de una prueba de ANOVA y el gráfico de residuales.

La evidencia de un ajuste adecuado y el cumplimiento de los supuestos sobre los coeficientes del modelo de regresión lineal no se consideran suficientes si el gráfico de residuales evidencia una relación no lineal.

# Criterios de evaluación

• Si se evidencia que la pendiente difiere significativamente de 1 puede inferirse que existe un efecto de matriz proporcional a la concentración en el rango de trabajo.



- Si se evidencia que el intercepto difiere significativamente de 0 puede inferirse que existe una interferencia de fondo o constante por efecto de la matriz biológica.
- Si se evidencia un comportamiento no lineal en el sistema, inclusive cuando los criterios para pendiente e intercepto se cumplen, puede inferirse que existe un efecto de matriz sistemático, que puede obedecer por ejemplo a factores físico-químicos, instrumentales, entre otros.
- Cuando se verificó que no se cumplen estos supuestos, se estimó un factor o un modelo de corrección por efecto de matriz. Este afecto de matriz se evaluó por medio de sistemas de regresión por adición de estándar (AE) y estándar acuoso (EA) respectivamente.
- Si ocurre al menos una de las situaciones antes enunciadas, se procede a determinar un factor de corrección por efecto de matriz

# Desarrollo de la función de ajuste por efecto de matriz

Del modelo de regresión de cada una de las treces curvas se calculó la primera derivada, obteniendo una función de sensitividad que predice la pendiente en cada nivel de concentración de analito.

 $\mathbf{A} = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1 \mathbf{C} + \mathbf{b}_2 \mathbf{C}^2$ Ecuación 29. Modelo de regresión

$$\label{eq:constraint} \begin{split} \mathbf{E}_{i} = & 2\mathbf{b}_{2}\mathbf{C} + \mathbf{b}_{1} \\ \text{Ecuación 30. Función de sensitividad} \end{split}$$

Donde:

A es la absorbancia

**b**<sub>2</sub>, **b**<sub>1</sub> y **b**<sub>0</sub> son los coeficientes de sensibilidad del modelo de regresión.

C es la concentración del analito en el paso 6 indicado en la **Ilustración 31** 

 $E_i$  es la sensitividad, expresada como la variación de la pendiente del modelo de regresión, en función del nivel *i* de concentración.

La primera derivada de la función de calibración expresa la variabilidad de la pendiente en función de la concentración total del analito. Cuando se tratan de modelos de primer orden, se cuenta con una sola pendiente, cuando la matriz no afecta lo suficiente para producir diferencias significativas entre la pendiente de un sistema de adición patrón y un sistema de calibración en medio acuoso se infiere que los posibles efectos de matriz son cuantitativamente despreciables. En el caso de los modelos cuadráticos la pendiente es de por sí variable, pero esta variabilidad se supone no ser significativamente diferente entre un sistema con matriz biológica y un sistema con solvente acuoso cuando el efecto de matriz no es un factor de error considerable.



La variación de la pendiente del sistema con matriz biológica en función del sistema en solvente acuoso se define como factor de recuperación y sirve como corrector del efecto de matriz. Se estimó el factor de ajuste por efecto de matriz (factor de recuperación) en cada nivel de adición, para cada curva, relacionando la sensitividad del sistema de adición patrón con la sensitividad del sistema de calibración acuosa del respectivo nivel, aplicando la **Ecuación 31** 

$$F_{R} = \frac{E_{AEi}}{E_{EAi}}$$
  
Ecuación 31

Donde:

 $F_R$  es el factor de corrección por efecto de matriz,  $E_{AEi}$  es la pendiente del sistema de adición de patrón (AE) en el nivel *i* de adición y  $E_{EAi}$  corresponde a la pendiente del sistema de calibración acuosa (EA) en el nivel *i* de concentración.

Esta relación permitió evaluar el efecto de matriz en la medición, por medio de un modelo que relaciona la concentración adicionada con el factor calculado ( $F_R$ ). Una vez que se obtiene una estimación de la concentración por interpolación con curva de calibración acuosa, esta relación permite calcular un efecto de corrección por efecto de matriz que se aplicará al valor obtenido. El modelo para calcular  $F_R$  consiste en una función cuadrática que marca la tendencia decreciente de la sensibilidad del sistema por el efecto de matriz en relación a la disminución de la pendiente en sistemas acuosos.

$$\label{eq:FR} \begin{split} \mathbf{F}_{\!R} = & \mathbf{p}_2 \cdot \mathbf{c}^2 + \mathbf{p}_1 \cdot \mathbf{c} + \! \mathbf{p}_0 \\ \text{Ecuación 32. Función de ajuste por efecto de matriz} \end{split}$$

Donde  $p_2$ ,  $p_1$  y  $p_0$  son los coeficientes de regresión el  $F_R$  en función de **c** Las figuras de mérito de la función de corrección fueron determinadas con el mismo procedimiento utilizado para evaluar la linealidad de la curva de calibración. Se determinó el *corredor de errores de predicción* y los componentes de variabilidad de la curva.

# 4.2.2.4. Evaluación del efecto de la dilución

El factor de corrección por dilución se calcula por medio de un modelo polinomial de segundo orden que correlaciona este factor de ajuste con el factor de dilución teórico. Para desarrollar este modelo se prepararon una serie de soluciones acuosas de AlCl<sub>3</sub> patrón en diferentes concentraciones y un blanco de solvente, se realizó la medición espectrofotométrica de cada una y se registraron las absorbancias. La absorbancia corregida con el blanco más alta que fue posible medir se tomó como base para calcular el factor de corrección efectivo. El cálculo se efectuó con la **Ecuación 33** 



$$F_{\text{Dexp}_{i}} = \frac{A_{i} - A_{\text{blk}}}{A_{1} - A_{\text{blk}}}$$
  
Ecuación 33

Donde  $A_i$  es la absorbancia de una solución acuosa de AlCl<sub>3</sub> en el nivel i de dilución;  $A_{blk}$  es la absorbancia del blanco de solvente;  $A_1$  es la absorbancia de la solución más concentrada medible, identificada como dilución 1 o factor de dilución 1 (FD = 1)

Con la **Ecuación 33** se resuelve una fuente de error por efecto de la dilución de las soluciones. Comúnmente se asume que la relación de la señal, **A**, contra el factor de dilución, **FD**, es exponencial en una razón constante, **k**, idealmente igual a 1 como múltiplo de la base y un exponente, **x**, idealmente igual a 1, tal como lo expresa la **Ecuación 34**.

# $A = k \cdot FD^{-x}$ Ecuación 34

Donde:

$$FD = \frac{\prod_{i=1}^{i=k} V_{di}}{\prod_{i=1}^{i=k} V_{ai}}$$

Ecuación 35

$$\prod_{i=k}^{i=k} V_{di} \prod_{i=k}^{i=k} V_{i}$$

Siendo  $\overline{i=1}$  y  $\overline{i=1}$  los productos de volúmenes de dilución (volumen final) y de alícuota (inicial) respectivamente. Se asume que esta proporción tiene una relación inversamente proporcional a la señal de la medición, sin otra variable que interfiera en la misma; de manera que la relación entre **FD** y **A** siempre se mantiene constante, idealmente igual a 1, como lo expresa la **Ecuación 36** 

$$k = \frac{A}{FD}$$
Ecuación 36

Introduciendo logaritmos en ambos lados, la **Ecuación 34** queda expresada como una función lineal de primer orden

LogA = Logk - xLogFDEcuación 37



Donde idealmente **LogK=0** y x, la pendiente en el modelo, idealmente es igual a 1, la ecuación se expresa como **LogA = pFD**; Sin embargo, este supuesto sólo es práctico cuando las relaciones entre la señal y la concentración/masa del analito son de primer orden. En el caso de sistemas no lineales, los modelos de dilución-señal tendrían el mismo comportamiento que la relación concentración/masa-señal, por haber una relación entre dilución-volumen-concentración-masa. Cuando los calibradores son diluidos de la misma manera que las muestras, este efecto puede considerarse "absorbido" por el sistema, enfatizando el ajuste especialmente en el efecto de matriz (matemáticamente el factor de dilución se multiplica y divide simultáneamente). Cuando las muestras son pre-diluidas o son sometidas a diluciones adicionales, debe ser considerado el ajuste por efecto de dilución, en vista de que el modelo de calibración no es influido por estas operaciones. La **Ecuación 34** debe ser corregida entonces para ajustarse al modelo de calibración efectivo y entonces ser aplicado a las diluciones no incluidas en el procedimiento de calibración química.

Se llevó a cabo un experimento para estimar un modelo que ajuste el factor de dilución calculado por la **Ecuación 35** con el factor de corrección experimental o efectivo ( $FD_{exp}$ ) calculado por la **Ecuación 33**. Este modelo permite una predicción del factor de corrección por efecto de dilución ( $F_D$ ). Se prepararon cuatro soluciones de AlCl<sub>3</sub> patrón en diferentes niveles de dilución, utilizando como solvente una mezcla de HNO<sub>3</sub> 1% y ácido cítrico 1% en agua desionizada. Cada solución fue medida directamente en el espectrofotómetro, sin tratamientos previos o adicionales. Las diluciones se exponen en la **Tabla 12** 

Solución patrón AlCl <sub>3</sub> en mezcla acuosa de HNO <sub>3</sub> 1% y ácido cítrico 1%					
V <sub>a1</sub>	V <sub>d1</sub>	V <sub>a2</sub>	V <sub>d2</sub>	FD	
25 μL	125 μL			5	
50 μL	25 mL			500	
25 μL	125 μL	25 μL	25 mL	5000	
25 μL	400 μL	50 μL	50 mL	16000	
*Todas las soluciones fu	eron preparadas indepen	dientemente	•		

Tabla 12. Guía de preparación de diluciones para la determinación del factor de ajuste

Se obtuvo en primera instancia un modelo lineal simple, representado por la **Ecuación 38**, transformando previamente las absorbancias a valores logarítmicos (LogA) y el factor de dilución experimental a logaritmos negativos (-LogFD = pFD).

 $LogA = x \cdot pFD + Logk$ Ecuación 38

Se verificaron los siguientes supuestos para la pendiente y el intercepto del modelo

H <sub>0</sub> : x = 1	$H_0$ : Log k = 0
H <sub>a</sub> : x ≠ 1	H <sub>a</sub> : Log k ≠ 0

Los estadísticos de prueba aplicados son respectivamente:

$$\mathbf{t}_{\exp} = \frac{\mathbf{x} - 1}{\mathbf{S}_{\mathbf{x}}} \qquad \qquad \mathbf{t}_{\exp} = \frac{\mathbf{k} - 0}{\mathbf{S}_{\mathbf{k}}}$$



Donde S<sub>x</sub> y S<sub>k</sub> son las desviaciones estándar de la pendiente y el intercepto respectivamente. Estos estimadores son calculados utilizando en forma análoga la **Ecuación 25, Ecuación 26** y **Ecuación 28** 

Si se aceptan la hipótesis nulas de que la pendiente no difiere significativamente de 1 y el intercepto no difiere estadísticamente de 0, ambas con un 95% de confianza, puede inferirse que el comportamiento lineal del efecto de la dilución no es suficientemente influyente en el error de la medición.

Alternativamente se elabora entonces un modelo cuadrático (**Ecuación 39**) y se cotejan con el modelo lineal simple. En este caso no se aplica el test de Mandel debido a que los grados de libertad son muy pequeños para dar un diagnóstico confiable.

 $LogA = x_2 \cdot pFD^2 + x_1 \cdot pFD + Logk$ Ecuación 39

En base a las conclusiones de estas pruebas se define una función predictiva de corrección por efecto de dilución, correlacionando el factor de dilución calculado teóricamente (**Ecuación 35**) contra el factor empírico, estimado de datos experimentales (**Ecuación 33**). La función correctiva se expresa en la **Ecuación 40** 

$$\label{eq:FD} \begin{split} \textbf{F}_{\textbf{D}} = \textbf{q}_2 \cdot \textbf{F} \textbf{D}^2 + \textbf{q}_1 \cdot \textbf{F} \textbf{D} + \textbf{q}_0 \\ \textbf{Ecuación 40} \end{split}$$

Donde  $F_D$  es el factor de corrección por efecto de la dilución;  $q_2$ ,  $q_1$  y  $q_0$  son los coeficientes de sensibilidad del modelo y FD es el factor de dilución aplicado.

# 4.2.2.5. Límite de Decisión

Se definió el límite de decisión como la concentración máxima de aluminio elemental que podría considerarse *normal* en un contenido estomacal, con un riesgo  $\alpha$  de un error tipo I (aceptar un verdadero "negativo") y un riesgo  $\beta$  de un error tipo II (rechazar un valor "no negativo"). Considerando que el aluminio es un elemento natural en el espécimen y no podría establecerse un blanco de muestra real, se determinó un valor promedio y una desviación estándar de concentraciones de aluminio elemental en contenidos gástricos aceptados como "normales" para establecer un límite cut off.

Los especímenes seleccionados fueron identificados como "verdaderos negativos" (VN). Las muestras fueron tratadas de manera ordinaria, procesadas conforme al método desarrollado.

Se evaluó la normalidad de los datos obtenidos, se calculó la media y el desvío estándar.

Una vez verificada la normalidad de los datos, se realizó un experimento de simulación de Monte Carlo para estimar el límite superior del intervalo de valores que pueden catalogarse como



normales. Se estableció como límite de decisión el valor de concentración que puede ser atribuido estadísticamente al menos al 95% de las muestras negativas (error alfa  $\alpha$  = 0,05 de una cola) con la **Ecuación 41** 

 $\mathbf{CC}_{\alpha} = \mathbf{c}_{\mathbf{x}(\mathsf{sim})} + \mathbf{z}_{(1-\alpha)} * \sigma_{(\mathsf{sim})}$ Ecuación 41

Donde  $C_x(sim)$  es la concentración calculada en una simulación de N datos ( $N_{sim}$ =10000) con la función de análisis expresada en la **Ecuación 85**, utilizando los coeficientes de regresión obtenidos en condiciones de precisión entre días (**Ecuación 59**), con sus respectivas desviaciones estándar (**Ecuación 79**, **Ecuación 80** y **Ecuación 81**). Este experimento simuló 10 000 mediciones realizadas

un número de posibles coeficientes de regresión. El valor de  $\sigma^{(sim)}$  es la desviación estándar obtenida es la simulación. Para este experimento se insertaron la **Ecuación 32** y la **Ecuación 40** en la **Ecuación 85**, resultando la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** 



# Ecuación 42

Los coeficientes  $\mathbf{p}_2$ ,  $\mathbf{p}_1$ ,  $\mathbf{p}_0$ ,  $\mathbf{q}_2$ ,  $\mathbf{q}_1$  y  $\mathbf{q}_0$ , así como las variables  $\mathbf{V}_{d1}$  y  $\mathbf{V}_{d2}$  se mantuvieron constantes debido a que pertenecen a funciones normadas que no cambiarán durante los ensayos rutinarios.

El software utilizado para estos experimentos fue **Quantum XL para Microsoft**<sup>®</sup> **Excel**<sup>®</sup> que opera como un complemento de Excel<sup>®</sup> para ejecutar la simulación de Monte Carlo de modelo y análisis creados en las hojas de cálculo.

Se programó la simulación estableciendo el límite de detección como límite inferior de aceptación. Los valores simulados por debajo de este límite se contabilizaron automáticamente por medio del software.

# 4.2.3. Pruebas de Validación

Se evaluaron los parámetros de desempeño que por acuerdo general se consideran básicos para la validación de métodos cuantitativos de bioanálisis:

- a) El modelo de calibración (linealidad)
- b) La exactitud (sesgo, repetibilidad, la precisión intermedia)
- c) La recuperación
- d) La estabilidad
- e) El límite inferior de cuantificación (LLOQ) y límite de detección (LD)
- f) La selectividad



Se determinó también la sensitividad, que es una de las figuras de mérito más relevantes en la espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica.

Para el diseño de los experimentos de validación y el establecimiento de los criterios de evaluación se tomó como referencia la *Guía de la GTFCh para la garantía de la calidad en estudios toxicológicos forenses<sup>b</sup>* (GTFCh: German speaking Society of Toxicological and Forensic Chemistry), específicamente del apéndice B, *Requisitos para la validación de métodos analíticos* (primera versión revisada, 01.06.2009). Esta guía a su vez se basa en el Informe de la Conferencia II, *Validación de métodos de análisis: biodisponibilidad, bioequivalencia y los estudios farmacocinéticos*, patrocinada por la Asociación Americana de Científicos Farmacéuticos y la Food and Drug Administration de los Estados Unidos.

Estas guías fueron elaboradas enfocadas en el bioanálisis, pero especialmente para ensayos de moléculas y para métodos cromatográficos y de espectrofotometría molecular; de manera que fue necesario adaptarlas a la validación de un método de espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, considerando las particularidades del caso. No se encontró una guía especial para la validación de métodos de espectrofotometría atómica.

# 4.2.3.1. El modelo de calibración (linealidad)

Se evaluó la capacidad del método analítico para generar mediciones proporcionales a la concentración de analito en la muestra, en un rango determinado, y que esa proporcionalidad es predecible por un modelo matemático

Se evaluó la linealidad de calibración por interpolación con estándar acuoso (IEA)

Se elaboraron seis réplicas de calibradores acuosos en cinco niveles diferentes, distribuidos de manera uniforme, incluyendo el nivel cero. Los calibradores fueron preparados a partir de una solución de referencia con una concentración de aluminio elemental de 1000 mg/L. La preparación consistió en transferir con una micropipeta Eppendorf un número de porciones de 50  $\mu$ L de solución patrón a matraces volumétricos clase A de 5 mL y completar el volumen de dilución con una solución de ácido nítrico calidad ultratrazas al 1% v/v y ácido cítrico ultrapuro 1%p/v en agua destilada y desionizada. La guía de preparación se muestra en la **Tabla 13** 

Nivel de calibrador	Porciones de volúmenes (50µl) de solución patrón (n)	Volumen de solución patrón	Volumen de dilución	Concentración nominal (mg/L)
0	0	0	5 mL	0
1	1	50 μL	5 mL	10
2	2	100 μL	5 mL	20
3	3	150 μL	5 mL	30
4	4	200 μL	5 mL	40

Tabla 13. Guía de preparación de calibradores para el ensayo de aluminio por espectrofotometría de absorción atómica

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen



Las concentraciones nominales corresponden a la cantidad del analito en cinco mililitros. Estas soluciones son diluidas la misma manera que las muestras, como se indica a partir del paso del esquema representado en la **llustración 31** Se realizó la medición conforme al método establecido.

# 1.1 Normalidad de las mediciones

Se realizaron pruebas para detectar datos atípicos en cada nivel durante las mediciones. Se aplicaron el test de Grubbs (nivel de significación: 95%) y test de Huber. Ante un dato outlier ser repitió la réplica para corregir la falla.

Se estableció que el total de datos atípicos no puede ser más de dos y estos no deben producirse en el mismo nivel de concentración.

Se verificó la normalidad de las mediciones por evaluación visual de gráficos de probabilidad normal y el test de Anderson-Darling para una distribución normal. La prueba de Anderson-Darling es una prueba no paramétrica que sirve para valorar si los datos de una muestra provienen de una distribución específica, en este caso una distribución normal. Es adecuada para muestras pequeñas y es una de las herramientas estadísticas más potentes para la detección de la mayoría de las desviaciones de la normalidad. Los cálculos para la detección de valores atípicos fueron realizados en Excel<sup>®</sup>, en tanto que el gráfico de probabilidad normal y la prueba de Anderson-Darling se realizaron utilizando Minitab<sup>®</sup> 14

Se estableció aceptar la distribución de las réplicas como una distribución normal cuando el valor de probabilidad **p** es mayor que 0,05 (95% de confianza) en el test Anderson-Darling

En la valoración visual de las gráficas, se considera una distribución normal de los puntos sobre el gráfico de probabilidad cuando son adyacentes a la línea trazada. Esta apreciación es subjetiva y se aceptan algunas desviaciones en vista del número reducido de réplicas.

# **1.2 Homogeneidad de varianzas**

Se verificó la homogeneidad de la varianza efectuando una prueba de Fisher con la varianza correspondiente a la concentración más alta contra la respectiva al nivel más bajo (confianza 99%)

El modelo se considera homocedástico si el valor F calculado es menor al valor F tabulado a un 99% de confianza. En caso contrario el modelo se considera heterocedástico y se procede a calcular ponderación para compensar el efecto.

# 1.3 Ajuste del modelo

Se estudió el modelo de regresión lineal simple (RLS) contra el modelo de regresión cuadrática (QUAD), evaluando el ajuste de ambos algoritmos con la prueba de linealidad de Mandel (confianza 99%)

El <u>test de Mandel</u> se basa en el supuesto de que las desviaciones relativamente grandes de los valores medidos en una función lineal de primer orden son causadas por la no linealidad y que



puede ser reducida mediante la selección de un modelo "mejor" de regresión, en este caso una función de segundo orden.

Para ello se usan las funciones de calibración de primer orden y de segundo orden, incluyendo sus respectivas desviaciones estándar residuales. Se calcula la diferencia de las variaciones ( $DS^2$ ) utilizando la desviación estándar residual  $S_{A1}$  (a partir de la función de calibración de primer orden) y  $S_{A2}$  (a partir de la función de calibración de calibración de segundo orden) y sus grados de libertad, conforme a la **Ecuación 43** 

$$DS^{2} = (N-2) \cdot S^{2}_{A_{1}} - (N-3) \cdot S^{2}_{A_{2}}$$

# Ecuación 43

El valor de prueba, VP, se calcula para la prueba F

$$\mathbf{VP} = \frac{\mathbf{DS}^2}{\mathbf{S}_{\mathbf{A}_2}^2}$$

# Ecuación 44

**VP** se compara con el valor correspondiente en la tabla **F**, para los grados de libertad  $gl_1 = 1$  (grados de libertad de VP) y  $gl_2 = N - 3$ , (P = 99%)

Se tomaron como guía de evaluación los siguientes criterios:

■ Si VP ≤  $F_{tabla}$ , entonces la segunda función de calibración para no servirá de mucho para un mejor ajuste y la función de calibración puede seguir un modelo de regresión lineal simple (RLS)

• Si VP >  $F_{tabla}$ , entonces se recomienda la revisión y optimización del proceso analítico hasta donde sea factible para lograr un modelo de calibración de primer orden. Cuando esto no sea posible, por ejemplo por causas fisicoquímicas, y este es el caso de las mediciones por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, debería ser reducido el rango de trabajo hasta un intervalo donde el comportamiento sea rectilíneo. En última instancia se opta por un modelo de calibración de segundo orden.

También se compararon los gráficos de los residuales para cada modelo de calibración, verificando que la distribución de los puntos sea aleatoria. Un ordenamiento semicircular de los residuales del modelo de primer orden, indica un comportamiento no lineal en el sistema, esto se confirma cuando los mismos datos generan residuales sin un orden cuando se aplica el modelo de segundo orden, en este caso el modelo de regresión cuadrática (QUAD)

Una vez verificada la normalidad de las repeticiones, la homogeneidad de las varianzas y la ausencia de datos anómalos se llevó a cabo una prueba de falta de ajuste por análisis de varianza. De la suma cuadrada de errores de la regresión y la desviación residual se genera un valor F



experimental ( $F_{lof}$ ) que es comparado con un valor crítico. Cuando  $F_{lof} > F_{tabla}$  y el valor p < 0,05 entonces puede inferirse que el ajuste del modelo es adecuado.

Para un modelo cuadrático los algoritmos de cálculo para los coeficientes de sensibilidad son las siguientes ecuaciones.

Para un modelo de calibración:

$$\mathbf{A} = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1 \mathbf{c}_1 + \mathbf{b}_2 \mathbf{c}_1^2$$

Ecuación 45

$$\mathbf{b}_0 = \frac{1}{\mathbf{N}} (\Sigma \mathbf{\overline{A}}_i - \mathbf{b}_1 \cdot \Sigma \mathbf{c}_i - \mathbf{b}_2 \cdot \Sigma \mathbf{c}_i^2)$$

Ecuación 46

j, en el nivel de concentración ci

Donde **N** es el número de calibradores;  $\mathbf{A}_i$  es la de la absorbancia media de un número de réplicas

$$\mathbf{b}_1 = \frac{\mathbf{Q}_{\mathbf{c}\cdot\mathbf{A}} - \mathbf{b}_2 \cdot \mathbf{Q}_{\mathbf{c}^3}}{\mathbf{Q}_{\mathbf{c}\mathbf{c}}}$$

Ecuación 47

$$\mathbf{b}_{2} = \frac{\mathbf{Q}_{\mathbf{c}\cdot\mathbf{A}}\cdot\mathbf{Q}_{\mathbf{c}^{3}} - \mathbf{Q}_{\mathbf{c}^{2}\mathbf{A}}\cdot\mathbf{Q}_{\mathbf{c}\mathbf{c}}}{\left(\mathbf{Q}_{\mathbf{c}^{3}}\right)^{2} - \mathbf{Q}_{\mathbf{c}\mathbf{c}}\cdot\mathbf{Q}_{\mathbf{c}^{4}}}$$

Ecuación 48

$$\mathbf{Q}_{cc} = \Sigma \mathbf{c}^2 - \frac{(\Sigma \mathbf{c}_i)^2}{N}$$

Ecuación 49

$$\mathbf{Q}_{\mathbf{c}\cdot\mathbf{A}} = \Sigma(\mathbf{c}_{i}\cdot\overline{\mathbf{A}}_{i}) - \left[\frac{(\Sigma\mathbf{c}_{i})\cdot(\Sigma\overline{\mathbf{A}}_{i})}{N}\right]$$

Ecuación 50

$$\boldsymbol{Q}_{\boldsymbol{c}^{3}} = \boldsymbol{\Sigma}\boldsymbol{c}_{\boldsymbol{i}}^{3} - \left[\frac{(\boldsymbol{\Sigma}\boldsymbol{c}_{\boldsymbol{i}}) \cdot (\boldsymbol{\Sigma}\boldsymbol{c}_{\boldsymbol{i}}^{2})}{\boldsymbol{N}}\right]$$

Ecuación 51



$$\mathbf{Q}_{\mathbf{c}^4} = \Sigma \mathbf{c}_{\mathbf{i}}^4 - \frac{\left(\Sigma \mathbf{c}_{\mathbf{i}}^2\right)^2}{N}$$

Ecuación 52

$$\mathbf{Q}_{\mathbf{c}^{2}\cdot\mathbf{A}} = \Sigma(\mathbf{c}_{i}^{2}\cdot\mathbf{A}_{i}) - \left[\frac{(\Sigma\mathbf{A}_{i})\cdot(\Sigma\mathbf{c}_{i}^{2})}{N}\right]$$

# Ecuación 53

En la práctica los coeficientes también fueron calculados por medio de MINITAB<sup>®</sup> y una calculadora Texas Instruments TI-83 Plus. No se observó diferencias en las estimaciones para las primeras nueve cifras decimales. Las datos procesados por MINITAB<sup>®</sup> fueron copiados a las hojas de cálculo en Excel<sup>®</sup> con números de hasta once cifras decimales. Los valores obtenidos por la TI-83 Plus fueron exportados con nueve cifras decimales.

# Valores de dispersión de la curva de calibración en condiciones de repetibilidad

Se calcularon las siguientes figuras que representan la variabilidad del proceso de medición analítica

# Desviación estándar residual

Dispersión de los valores de medición en relación de la recta de regresión en condiciones de repetibilidad (mismo día)

$$\mathbf{Sr}_{\mathbf{A}} = \sqrt{\frac{\Sigma (\mathbf{A}_{i} - \mathbf{\hat{A}}_{i})^{2}}{\mathbf{N} - 3}}$$

Ecuación 54

Donde <sup>A</sup>i es la absorbancia calculada a partir de la función de calibración (**Ecuación 45**) en el nivel i de concentración.

# **Sensitividad**

La sensitividad se define como variabilidad típica de la señal de respuesta en función de la concentración. Se calculó con la función de la primera derivada del modelo de calibración, utilizando los coeficientes de sensibilidad calculados por la **Ecuación 45** 

 $E(\overline{c}) = b_1 + 2 \cdot b_2 \cdot (\overline{c})$ Ecuación 55

Desvío estándar de la predicción de la concentración

$$Sr_{cx} = \frac{Sr_{A}}{E(\overline{c})} \cdot 100\%$$
  
Ecuación 56

Desvío estándar relativo (RSDrcx[%]) del proceso en condiciones de repetibilidad

$$RSD_{rCx}[\%] = \frac{Sr_{Cx}}{\overline{c}} \cdot 100$$

Ecuación 57

Criterio de evaluación

Es aceptable un  $RSD_{Cx}[\%] \le 5\%$ 

# Intervalo de confianza de la medición

El intervalo de confianza con un riesgo  $\alpha$  del 5% para una concentración  $c_x$  estimada por regresión se calcula con la **Ecuación 58** Esta valoración se realizó en condiciones de repetibilidad

$$IC_{Cx} = \frac{S_{rA} \cdot t_{(1-\alpha;N-3)}}{b_1 + 2b_2 \cdot \hat{C}_x} \cdot \left( \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{m} + \frac{1}{Q_{C^4} \cdot Q_{CC} - (Q_{C^3})^2}} \cdot \left[ (\hat{C}_x - \overline{C})^2 \cdot Q_{C^4} + \left( \hat{C}_x^2 - \frac{\Sigma C_i^2}{N} \right)^2 \cdot Q_{CC} - 2 \cdot (\hat{C}_x - \overline{C}) \cdot \left( \hat{C}_x^2 - \frac{\Sigma C_i^2}{N} \right) \cdot Q_{C^3} \right] \right)$$

Ecuación 58

# Valores de dispersión de la curva de calibración en condiciones de precisión intermedia

Se determinaron características de variabilidad del sistema de calibración en condiciones de reproducibilidad dentro del mismo laboratorio, con el mismo analista, en distintos días. Esta caracterización permite evaluar precisión intermedia del sistema y valoraciones de características de límite (Valor crítico, límite de detección y límite de cuantificación) con mejores aproximaciones, especialmente porque se incluye como factor el desgaste del horno de grafito y las fluctuaciones de intensidad de la lámpara de cátodo hueco.

Se elaboraron curvas de calibración, haciendo una repetición por día durante seis días. La preparación de los calibradores se efectuó con el mismo procedimiento expuesta en la **Tabla 13**. En esta etapa experimental cada repetición es identificada también como **j**. El número total de repeticiones es simbolizado como **m**.

Estos experimentos fueron realizados simultáneamente con los ensayos de precisión (durante 5 días consecutivos) y del blanco (durante 6 días consecutivos)



Para los cálculos se aplicaron modelos matriciales. La **Ecuación 59** estima los coeficientes de sensibilidad del modelo.

$$\mathbf{B}_{j} = \begin{bmatrix} \mathbf{b}_{0j} \\ \mathbf{b}_{1j} \\ \mathbf{b}_{2j} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}^{\mathsf{T}} \cdot \mathbf{C} \end{bmatrix}^{-1} \cdot \mathbf{C}^{\mathsf{T}} \cdot \mathbf{Y}_{j}$$



Donde  $\mathbf{B}_{j}$  es un vector compuesto por  $\mathbf{b}_{0j}$ ,  $\mathbf{b}_{1j}$  y  $\mathbf{b}_{2j}$ , que son estimadores para los coeficientes de sensibilidad de orden cero, primer orden y segundo orden respectivamente para la repetición j. C

es la matriz de concentración.  $Y_j$  es el vector de absorbancias ( $A_{ij}$ ) para cada nivel i de concentración ( $c_i$ ) en la repetición j

La matriz  $\mathbf{C}$  y el vector  $\mathbf{Y}_{j}$  se expresan de la siguiente manera

$$\mathbf{C} = \begin{vmatrix} 1 & c_{1j} & c_{1j}^{2} \\ 1 & c_{2j} & c_{2j}^{2} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & c_{Nm} & c_{Nm}^{2} \end{vmatrix} \qquad \mathbf{Y}_{j} = \begin{vmatrix} \mathbf{A}_{1j} \\ \mathbf{A}_{2j} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{Nm} \end{vmatrix}$$
  
Ecuación 60 Ecuación 61

Cuando los componentes de  $Y_j$  son sustituidos por las absorbancias medias de las m-repeticiones

de cada nivel ( $A_i$ ) se obtiene un vector **Y** con el que puede estimarse en la **Ecuación 59** en un solo paso los coeficientes de sensibilidad del modelo de calibración. Así la matriz **B**<sub>j</sub> se convierte en la matriz **B**.

$$\mathbf{B} = \begin{bmatrix} \mathbf{b}_0 \\ \mathbf{b}_1 \\ \mathbf{b}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}^\mathsf{T} \cdot \mathbf{C} \end{bmatrix}^{-1} \cdot \mathbf{C}^\mathsf{T} \cdot \mathbf{Y}$$

Ecuación 62

$$\mathbf{Y} = \begin{vmatrix} \mathbf{A}_1 \\ \mathbf{A}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{A} \end{vmatrix}$$

Donde AN Ecuación 63

Para deducir las fuentes de variabilidad del modelo de calibración, la **Ecuación 45** es expresada de la siguiente manera:



$$\mathbf{A}_{ij} = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1 \mathbf{c}_{ij} + \mathbf{b}_2 \mathbf{c}_{ij}^2 + \eta_j(\mathbf{c}_i) + \mathbf{e}_{ij}$$
  
Ecuación 64

Donde  $\mathbf{e}_{ij}$  representa el error constante de la medición  $\mathbf{A}_{ij}$ , siendo el número de repeticiones **j** constante y asumiendo por consecuencia que posee una distribución normal N(0,1);  $\eta_j(\mathbf{c}_i)$  es el error inducido por las repeticiones del proceso en el nivel de concentración i ( $\mathbf{c}_i$ ) y se asume con una distribución normal N (0,1). Este error tiene un efecto sobre cada coeficiente de sensibilidad del modelo. Este efecto de variabilidad en los coeficientes se asume con una distribución normal O.

La varianza de la medición  $A_{ij}$  para un cierto nivel de concentración  $c_x$  dentro del rango operativo de la curva de calibración (es decir  $c_1 \le c_x \le c_N$ ) está dada por la siguiente ecuación:

$$\sigma_{\mathbf{A}_{ij}(\mathbf{c}_{x})}^{2} = \sigma_{\eta_{j}(\mathbf{c}_{x})}^{2} + \sigma_{\mathbf{e}_{ij}}^{2}$$



Aplicando la **Ecuación 59** la varianza residual ( $\sigma_{\mathbf{e}_{ij}}^{2}$ ) puede ser estimada como  $\mathbf{s}_{Aj}^{2}$ 

$$\mathbf{S}_{Aj}^{2} = \left[\mathbf{Y}_{j} - \mathbf{C} \cdot \mathbf{B}_{j}\right]^{\mathsf{T}} \cdot \left[\mathbf{Y}_{j} - \mathbf{C} \cdot \mathbf{B}_{j}\right] \cdot \left[\mathbf{N} - 3\right]^{-1}$$
  
Ecuación 66

Así la varianza residual (en condiciones de reproducibilidad R) del modelo puede ser estimada por:

$$s^2_{A(R)} = \frac{\displaystyle\sum_{j=1}^{j=m} s^2_{Aj}}{m} \label{eq:same_state}$$
 Ecuación 67

Se advierte que no es igual aplicar la **Ecuación 62** a la **Ecuación 66** (utilizando **B** en lugar de **B**<sub>j</sub>), en este caso se obtendría la variabilidad del ajuste del modelo  $(SS_{LOF} = \sum (\overline{A_i} - \hat{A_i})^2 / (N-3))$  y no la varianza residual

Cuando se efectúan **m** repeticiones de ensayos a una muestra de concentración **c**<sub>x</sub> se obtiene una población de respuestas **A**<sub>(Cx)</sub> de distribución normal. La variabilidad de la predicción (<sup>A</sup><sub>j</sub>) para cada medición **j**, que se define como  $\sigma_{A_{ij}(c_x)}^2$ , es teóricamente estimada por la **Ecuación 68** (cuando c<sub>x</sub> es desconocido no puede ser aplicado)

$$\mathbf{S}_{\hat{\mathbf{A}}_{j}(\mathbf{C}_{\mathbf{X}})}^{2} = \mathbf{S}_{\mathbf{A}_{j}}^{2} \cdot \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{c}_{\mathbf{X}} & \mathbf{c}_{\mathbf{X}}^{2} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mathbf{C}^{\mathsf{T}} \cdot \mathbf{C} \end{bmatrix}^{-1} \cdot \begin{bmatrix} 1 \\ \mathbf{c}_{\mathbf{X}} \\ \mathbf{c}_{\mathbf{X}}^{2} \end{bmatrix}$$

# Ecuación 68

La variabilidad de las repeticiones, que se define por  $\sigma_{\eta_j(\mathbf{c}_x)}^2$ , se estima con la media de las varianzas de **m** repeticiones y la varianza empírica de las mismas

$$S_{m}^{2} = \frac{\sum \left(\hat{A}_{j(C_{x})} - \frac{\sum \hat{A}_{j(C_{x})}}{m}\right)^{2}}{m-1} - \frac{\sum S_{\hat{A}_{j}(C_{x})}^{2}}{m}$$

Ecuación 69

Donde  $A_{j(C_x)}$  es la estimación de cada conjunto de coeficientes de regresión calculados por la **Ecuación 59** y puede ser obtenido por un modelo matricial, donde el resultado es un escalar

$$\hat{\mathbf{A}}_{\mathbf{j}(\mathbf{C}_{\mathbf{x}})} = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{c}_{\mathbf{x}} & \mathbf{c}_{\mathbf{x}}^{2} \end{bmatrix} \cdot \mathbf{B}_{\mathbf{j}}$$
  
Ecuación 70

La sumatoria de cada resultado de la **Ecuación 70** dividido entre el número de repeticiones estima una media poblacional de predicciones ( $\mu_0$ ) para un nivel de concentración **C**<sub>x</sub>, asumiendo una distribución normal. La media de la varianzas es un estimador del error aleatorio inducido por la

medición individual de una función de calibración en un nivel de concentración  $C_x$ .

Aplicando la ley gaussiana de propagación de la incertidumbre, el error aleatorio del promedio de las mediciones estimadas, para una muestra de concentración  $C_x$ , puede ser calculada como sigue:

$$S_{A(C_x)}^2 = \frac{\left(S_m^2 + \frac{\sum S_{A_j(C_x)}^2}{m}\right)}{m}$$



La varianza total de la imprecisión de la predicción  $\mathbf{\hat{A}}(\mathbf{c}_x)$  consiste en tres componentes: la varianza del error de la medición, la varianza del error entre repeticiones y la varianza del error de estimación. Un estimador de la varianza total de la predicción está dado por la suma de las tres varianzas:

$$\boldsymbol{S}^2_{\boldsymbol{R}_{(\text{total})}} = \boldsymbol{S}^2_{\boldsymbol{A}(\boldsymbol{R})} + \boldsymbol{S}^2_{\boldsymbol{m}} + \boldsymbol{S}^2_{\boldsymbol{\hat{A}}(\boldsymbol{C}_{\boldsymbol{x}})}$$

Ecuación 72



Con estos tres componentes es factible calcular los parámetros de variabilidad de la curva de calibración. Más adelante serán útilies también para el cálculo de los parámetros de umbral del método (Valor crítico, límite de detección y límite de cuantificación)

# Desviación estándar en condiciones de repetibilidad

La desviación estándar en condiciones de repetibilidad, inferida por el modelo entre días, para un nivel de concentración **Cx** se calcula a partir del error de la medición

$$\boldsymbol{S}_{r(CAL)} = \left(\frac{d\hat{\boldsymbol{A}}(\boldsymbol{C}_{\boldsymbol{X}})}{d\boldsymbol{C}_{\boldsymbol{X}}}\right)^{-1} \cdot \sqrt{\boldsymbol{S}_{\boldsymbol{A}(\boldsymbol{R})}^{2}} = \frac{1}{2 \cdot \boldsymbol{b}_{2} \cdot \boldsymbol{C}_{\boldsymbol{X}} + \boldsymbol{b}_{1}} \cdot \sqrt{\boldsymbol{S}_{\boldsymbol{A}(\boldsymbol{R})}^{2}}$$

# Ecuación 73

Se calculó el desvío estándar relativo para cada nivel medio de concentración de la curva

$$\text{RSD}_{r(\text{CAL})}[\%] = \frac{\text{S}_{r(\text{CAL})}}{\text{C}_{x}} \cdot 100$$

# Ecuación 74

# Desviación estándar en condiciones de reproducibilidad intermedia (intralaboratorio)

La desviación estándar en condiciones de repetibilidad para un nivel de concentración **Cx** se calcula a partir del error de la medición y de las repeticiones

$$\boldsymbol{S}_{\boldsymbol{R}(\boldsymbol{CAL})} = \frac{1}{2 \cdot \boldsymbol{b}_2 \cdot \boldsymbol{C}_{\boldsymbol{x}} + \boldsymbol{b}_1} \cdot \sqrt{\boldsymbol{S}_{\boldsymbol{A}(\boldsymbol{R})}^2 + \boldsymbol{S}_m^2}$$

# Ecuación 75

Se calculó el desvío estándar relativo para cada nivel de concentración de la curva

$$RSD_{R(CAL)}[\%] = \frac{S_{R(CAL)}}{C_{x}} \cdot 100$$

# Ecuación 76

# Criterios de evaluación

Según la guía de referencia<sup>c</sup> se considera aceptable:

- Un  $\frac{\text{RSD}_{r(CAL)}[0/2]}{15\%} \le 15\%$  ( $\le 20\%$  en los niveles cercanos a los límites del rango de trabajo)
- Un  $\operatorname{RSD}_{R(CAL)}\left[\begin{smallmatrix}0\\0\end{smallmatrix}\right] \leq 15\%$  ( $\leq 20\%$  en los niveles cercanos a los límites del rango de trabajo)

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen



# Intervalo de confianza para la predicción en el nivel C<sub>x</sub>

El intervalo de confianza con un riesgo  $\alpha$  del 5% para la predicción de la señal de absorbancia en función de la concentración **Cx** se calculó en condiciones de precisión intermedia. Esto permitió la evaluación de otros parámetros de desempeño que requieren conocer la mayor variabilidad posible del método.

$$IC_{\hat{A}(c_x)} = \pm t_{(m-1/1-\alpha/2)} \cdot \sqrt{S_{total}^2}$$

Ecuación 77

# Intervalo de confianza de la medición en condiciones de reproducibilidad intermedia

El intervalo de confianza con un riesgo  $\alpha$  del 5% para la concentración **Cx** estimada por regresión puede ser calculada con la **Ecuación 78**.

$$\mathsf{IC}_{\mathsf{C}_{\mathsf{X}}} = \pm \frac{\mathsf{t}_{(\mathsf{m}-1/1-\alpha/2)}}{2 \cdot \mathsf{b}_2 \cdot \mathsf{C}_{\mathsf{X}} + \mathsf{b}_1} \cdot \sqrt{\mathsf{S}^2_{\mathsf{R}_{(\mathsf{total})}}}$$

# Ecuación 78

# Varianzas de los coeficientes de regresión

Los coeficientes del modelo son resultado de un proceso determinístico sujeto a una variabilidad sistemática. Estas varianzas son utilizadas para la evaluación de la incertidumbre de la medición

# Varianza de coeficiente b<sub>0</sub>

$$\mathbf{S}_{\mathbf{b}_{0}}^{2} = \frac{\boldsymbol{\Sigma}\mathbf{c}^{2}\cdot\boldsymbol{\Sigma}\mathbf{c}^{4} - \left(\boldsymbol{\Sigma}\mathbf{c}^{3}\right)^{2}}{\mathbf{m}\cdot\mathbf{d}} \cdot \mathbf{S}_{\mathbf{A}}^{2}$$

Ecuación 79

Varianza del coeficiente b<sub>1</sub>

$$\mathbf{S}_{\mathbf{b}_{1}}^{2} = \frac{(\mathbf{N}+1) \cdot \Sigma \mathbf{c}^{4} - (\Sigma \mathbf{c}^{2})^{2}}{\mathbf{m} \cdot \mathbf{d}} \cdot \mathbf{S}_{\mathbf{A}}^{2}$$

Ecuación 80

Varianza del coeficiente b<sub>2</sub>

$$\mathbf{S}_{\mathbf{b}_{2}}^{2} = \frac{(\mathbf{N}+1) \cdot \Sigma \mathbf{c}^{2} - (\Sigma \mathbf{c})^{2}}{\mathbf{m} \cdot \mathbf{d}} \cdot \mathbf{S}_{\mathbf{A}}^{2}$$

Ecuación 81



Donde **d** es la determinante de la matriz **D**, generada por la suma de cuadrados residuales. De hecho, los numeradores para cada ecuación consisten en la determinante derivada de la matriz **D**, correspondiente a cada coeficiente de sensibilidad

$$\label{eq:SSA} \begin{split} \text{SSA} &= \sum_{j=1}^{m} \sum_{i=1}^{N} \Bigl[ \textbf{b}_0 + \textbf{b}_1 \cdot \textbf{c} + \textbf{b}_2 \cdot \textbf{c}^2 - \textbf{A}_{ij} \, \Bigr] \cdot^2 \end{split}$$

Ecuación 82

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} \mathbf{N} + \mathbf{1} & \Sigma \mathbf{c} & \Sigma \mathbf{c}^2 \\ \Sigma \mathbf{c} & \Sigma \mathbf{c}^2 & \Sigma \mathbf{c}^3 \\ \Sigma \mathbf{c}^2 & \Sigma \mathbf{c}^3 & \Sigma \mathbf{c}^4 \end{bmatrix}$$

Ecuación 83

# 4.2.3.2. La exactitud (sesgo, repetitividad y precisión intermedia)

Se evaluó la capacidad del método para generar mediciones repetitivas y reproducibles en condiciones internas del laboratorio

Para evaluar este parámetro se dos prepararon dos mezclas, identificadas respectivamente como  $S_0$  (solución acuosa de AlCl<sub>3</sub>) y  $M_0$  (matriz fortificada con formulación de AlP)

# Preparación de mezclas de prueba

- Solución acuosa preparada de un patrón de referencia de aluminio, en concentración de 1,002 mg/L. Se transvasaron tres porciones independientes de solución patrón a un vial cónico de centrífuga, a cada una se adicionó 100 μL de solución de ácido cítrico 50% p/v y ácido clorhídrico 1% v/v. estas porciones fueron identificadas como S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub> respectivamente.
- M<sub>0</sub>: consistió en una mezcla de contenido gástrico preparada por disolución de 0,15 g de formulación comercial de fosfuro de aluminio (equivalente a 0,039805 g Al)<sup>d</sup> en aproximadamente 8 mL de contenido gástrico homogenizado. Una vez adicionada la porción del producto de AIP, se esperó que la reacción se completara, en una campana extractora de gases, liberando la fosfina y dejando el aluminio en forma de cloruro, hidróxidos y otras especies químicas posibles según la composición de la matriz. Esta mezcla se transvasó a un matraz volumétrico de 10 mL y se completó el volumen a la marca de aforo con contenido gástrico homogenizado. Seguidamente la mezcla se transvasó en varias porciones a viales cónicos y fue centrifugada por aproximadamente un minuto. Los sobrenadantes fueron combinados otra vez, y nuevamente se dividieron en tres alícuotas, transfiriendo a un vial cónico de cen trífuga cada una. Estas alícuotas son identificadas como M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>

<sup>&</sup>lt;sup>d</sup> La cantidad de material adicionado fue calculado para obtener una concentración de aproximadamente 3980,5 mg/L, que producirían mediciones cercanas al centro del rango lineal de trabajo, asumiendo una recuperación del 100% y que todo el aluminio finalmente se encontrará como AlCl<sub>3</sub>



respectivamente. A cada porción se adicionó 100  $\mu$ L de solución de ácido cítrico 50% p/v y ácido clorhídrico 1% v/v.

Las porciones fueron almacenadas a -20  $^{\circ}$ C y durante cinco días consecutivos cada una fue procesada según el esquema presentado en la **llustración 31**, como se indica en el paso 4 y paso 5, diluyendo cinco alícuotas de cada porción a partir del paso 6. En otras palabras, cada día fueron medidas cinco alícuotas de cada una de S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> respectivamente.

Las porciones fueron sometidas a cinco ciclos de congelamiento y descongelamiento, por lo que las mediciones diarias no solamente sirvieron para evaluar la precisión intermedia sino también la **estabilidad** de las muestras durante cinco días.

# Diseño experimental

Se efectuaron las mediciones de cinco alícuotas (réplicas) de tres porciones preparadas como se indica en el paso 2 y el paso 3 de la **llustración 31**, de dos muestras control, una elaborada con solución acuosa de patrón ( $S_0$ ) y otra con matriz biológica y formulación comercial ( $M_0$ ). De esta manera se evalúa la influencia de tres factores sobre la precisión de las mediciones:

- Preparación de la muestra (pasos 2 5)
- Réplicas (pasos 6 8)
- Día de la medición (pasos 2 8)

La preparación de las muestras control y el diseño experimental se exponen en la **Ilustración 9** y la **Ilustración 10** 

# Análisis de valores outliers

En vista de que las pruebas estadísticas aplicadas para esta etapa de la validación son sensibles a la normalidad de las muestras y parten del supuesto de ello, se realizaron pruebas para detectar datos atípicos en cada nivel durante las mediciones. Se aplicaron el test de Grubbs (nivel de significación: 95%). Como medida correctiva, los datos anómalos fueron repetidos hasta lograr conformidad en el test o hasta lograr un desvío estándar relativo menor al 15%. Se estableció como parámetro de aceptación hasta dos valores atípicos, en tanto no se encuentren en una misma serie de réplicas cada día.





# Ilustración 9. Diseño experimental y medición de la muestra control S<sub>0</sub>



# Ilustración 10. Diseño experimental para la preparación y medición de la muestra control M0





# Cálculo de concentraciones y corrección por efecto de dilución

El sesgo es la diferencia entre la medición y un valor aceptado como verdadero que sirve como punto de referencia. Se trata de una medida del componente de error sistemático de un procedimiento de análisis cuantitativo.

Se calculó la concentración experimental de cada alícuota por día de S<sub>0</sub>, partiendo del promedio de las réplicas obtenidas la absorbancia obtenida por la función de análisis, que parte de la fórmula cuadrática general para encontrar un conjunto solución, dado que el modelo de calibración seleccionado en la etapa de desarrollo es cuadrático. El algoritmo de cálculo originalmente se expresa como en la **Ecuación 84** 

$$\mathbf{C}_{exp} = \left[ \left( \underbrace{\left( -\mathbf{b1} \pm \sqrt{\mathbf{b_1}^2 - \mathbf{b_2} (\mathbf{b_0} - \mathbf{A_x} - \mathbf{A_{blk}})} \right)}_{2 \cdot \mathbf{b_2}} \right] \cdot \underbrace{\mathbf{V_{d1}}}_{\mathbf{V_{a1}}} \cdot \underbrace{\mathbf{V_{d2}}}_{\mathbf{V_{a2}}} \right] \cdot \mathbf{F_D}^{-1} \cdot \mathbf{FR}$$

# Ecuación 84 función de análisis para las muestras acuosas

Donde:

**b**<sub>2</sub>, **b**<sub>1</sub> y **b**<sub>0</sub> son los coeficientes de regresión para el modelo de calibración cuadrático;

**A**<sub>x</sub> es la absorbancia de la muestra

A<sub>blk</sub> es la absorbancia del blanco

V<sub>a1</sub> es el volumen de la alícuota para la primera dilución: 0,1 mL (paso 6)

**V**<sub>d1</sub> es el volumen de la primera dilución: 5,0 mL (paso 6)

V<sub>a2</sub> es el volumen de la alícuota para la segunda dilución: 0,025 mL (paso 7)

V<sub>d2</sub> es el volumen de la segunda dilución: 0,025 mL + 1,5 mL (paso 7)

 $\mathbf{F}_{\mathsf{D}}$  es el factor de ajuste por efecto de dilución.

**FR** es el factor de ajuste por efecto de matriz

De la **Ecuación 84** se utiliza la función positiva debido a que la función negativa da por lo general valores irreales. También, debido a que el efecto de la segunda dilución es efectivo en los mismos parámetros tanto para las muestras como los calibradores, el modelo se simplifica para la cuantificación <u>rutinaria</u><sup>e</sup>. La función de análisis aplicada es entonces la que se expresa en la **Ecuación 85** 

$$\mathbf{C}_{exp} = \left[\frac{\left(-\mathbf{b1} + \sqrt{\mathbf{b_1}^2 - \mathbf{b_2}(\mathbf{b_0} - \mathbf{A_x} - \mathbf{A_{blk}})}\right)}{2 \cdot \mathbf{b_2}}\right] \cdot \frac{\mathbf{V_{d1}}}{\mathbf{V_{a1}}} \cdot \mathbf{F_D}^{-1} \cdot \mathbf{FR}$$

Ecuación 85. Función de análisis simplificada

Para el cálculo de concentraciones en soluciones acuosas FR es igual a 1. En bajas concentraciones la corrección con el blanco no es recomendable debido a su variabilidad que puede dar lugar a señales netas erróneas.

<sup>&</sup>lt;sup>e</sup> Para la evaluación de la incertidumbre se toma como modelo la **Ecuación 84** 



# Cálculo y evaluación del sesgo

Se calculó la media de todas las determinaciones de S0 y la diferencia de esta con la concentración consignada en el certificado de la solución de referencia. El sesgo se calculó a partir de la diferencia y el valor aceptado como verdadero con la Ecuación 86:

sesgo[%] = 
$$\frac{\overline{\mathbf{X}} - \mu}{\mu} \cdot 100$$

# Ecuación 86. Cálculo de sesgo en escala porcentual

Donde:  $\overline{X}$  es la media de todas las concentraciones calculadas por la Ecuación 85;  $\mu$  es el valor consignado como verdadero en la certificación del patrón de referencia

Se consideran aceptables los valores de sesgo en un intervalo de ± 15% cuando se encuentran alrededor del punto medio en el rango de trabajo, y de ± 20% cuando se encuentran cerca del límite de los límites.

Esta prueba evalúa la inexactitud sistemática del método en sí mismo, sin tomar en cuenta el efecto de matriz. No fue posible determinar el sesgo en el espécimen biológico dado que no se cuenta con un material de referencia externo certificado para aluminio específicamente en contenido gástrico como matriz

# Repetibilidad y Precisión intermedia

Se calculó la imprecisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad entre días, expresados como desvíos estándar relativos, en escalas porcentuales, partiendo del análisis de varianzas ANOVA de los conjuntos de mediciones de M<sub>0</sub> y S<sub>0</sub>. La prueba de ANOVA se desarrolló para tres factores utilizando MATLAB. Se obtuvieron las sumas de cuadrados medios de las réplicas (varianza residual), las preparaciones y los días.

Previamente se verificó el supuesto de homogeneidad de las varianzas por el test de Harley. Se dividió la varianza máxima  $(S_{max}^{2})$  entre la mínima  $(S_{max}^{2})$  de las series de mediciones de cada día (Ecuación 87) y se comparó con el valor crítico tabulado

$$r_{C} = \frac{S_{max}^{2}}{S_{min}^{2}}$$

Ecuación 87

Si el valor del cociente calculado (r<sub>c</sub>) es mayor que el valor crítico con un 95% de confianza (r<sub>0.95</sub>), se dice que las varianzas no son homogéneas.

Se evaluó la variabilidad de las absorbancias medias agrupadas por réplicas, preparaciones y días de medición. Partiendo de la prueba de ANOVA, con las varianzas dentro de las réplicas, días y preparaciones, se determinó la repetibilidad y la precisión intermedia de laboratorio por la Ecuación 89 y la Ecuación 91.



# $\mathbf{S}_{\mathbf{r}}^2 = \mathbf{M}\mathbf{S}_{\mathbf{R}}$

# Ecuación 88. Cálculo de variación de la repetibilidad

Donde:

 $\mathbf{S}_{\mathbf{r}}^{2}$  es la varianza en condiciones de repetibilidad

**MS**<sub>R</sub> es la varianza dentro de los grupos (réplicas dentro del mismo día)

$$\mathbf{RSDr}[_{0}^{0}] = \frac{\sqrt{\mathbf{S}_{r}^{2}}}{\overline{\mathbf{X}}} \cdot 100 = \frac{\sqrt{\mathbf{MS}_{R}}}{\overline{\mathbf{X}}} \cdot 100$$

# Ecuación 89. Cálculo de la variabilidad de la varianza en condiciones de repetibilidad

# Donde:

**RSDr**[%] es la precisión en condiciones de repetibilidad expresado como el desvío estándar relativo en escala porcentual

 $\boldsymbol{S}_{\boldsymbol{r}}^{^{2}}$  es la varianza en condiciones de repetibilidad

 $\overline{\mathbf{X}}$  es la media de todas las determinaciones

MS<sub>R</sub> es la varianza dentro de los grupos (réplicas dentro del mismo día)

$$S_{D}^{2} = \frac{MS_{D} - MS_{R}}{n}$$

Ecuación 90. Cálculo de la variación entre los días

 $\mathbf{S}^2_{\mathbf{p}}$  es la varianza las mediciones entre los días

MS<sub>p</sub> es la varianza entre los grupos (días)

 $MS_{R}$  es la varianza dentro de los grupos (réplicas dentro del mismo día) n es el número de réplicas por día (para el diseño propuesto n = 5)

$$\mathsf{RSD}_{\mathsf{D}}[\%] = \frac{\sqrt{\mathsf{S}_{\mathsf{D}}^2 + \mathsf{S}_{\mathsf{r}}^2}}{\overline{\mathsf{X}}} \cdot 100$$

# Ecuación 91. Cálculo de la precisión dentro del laboratorio en diferentes días

Donde:

 $\mathsf{RSD}_{\mathsf{D}}[\%]$  es la precisión en condiciones de reproducibilidad entre días de medición

 $\boldsymbol{S}^2_{\boldsymbol{D}}$  es la varianza las mediciones entre los días

 $\mathbf{S}_{\mathbf{r}}^{2}$  es la varianza en condiciones de repetibilidad

 $\overline{\mathbf{X}}$  es la media de todas las determinaciones



# Intervalo de tolerancia

Se calculó el intervalo en el que se espera que al menos el 95% de las futuras medidas, en base al sesgo y la precisión que fueron calculados; no obstante, el intervalo calculado tomará como supuesto un mismo número de réplicas para el control rutinario y sólo dos factores, las réplicas y los días

$$\mathbf{L}_{I} = \operatorname{sesgo}[\%] - \mathbf{t}_{gl;0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{n} \cdot \mathbf{B}^{2}}} \cdot \mathbf{RSD}_{D}[\%]$$

Ecuación 92. Límite inferior del intervalo de tolerancia

$$\mathbf{L}_{s} = sesgo[\%] + \mathbf{t}_{gl;0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{n} \cdot \mathbf{B}^{2}}} \cdot \mathbf{RSD}_{D}[\%]$$

Ecuación 93. Límite superior del intervalo de tolerancia

$$B^{2} = \frac{R+1}{n \cdot R + 1}$$
  
Ecuación 94

$$\mathbf{gI} = \frac{(\mathbf{R}+\mathbf{1})^2}{\left(\frac{\left[\mathbf{R}+(\frac{1}{\mathbf{n}})\right]^2}{(\mathbf{p}-\mathbf{1})} + \frac{\left[\mathbf{1}-(\frac{1}{\mathbf{n}})\right]}{\mathbf{p}\cdot\mathbf{n}}\right)}$$

Ecuación 95. Grados de libertad

$$\mathbf{R} = \frac{\mathbf{S}_{\mathbf{D}}^2}{\mathbf{S}_{\mathbf{r}}^2}$$

Ecuación 96

Donde:  $L_{I}$  es el límite inferior del intervalo de tolerancia  $L_{s}$  es el límite superior del intervalo de tolerancia  $t_{gl;0,975}$  es el percentil 97,5% de la distribución t con grados de libertad **gl p** es el número de días **n** es el número de réplicas por día

# Criterios de evaluación

La evidencia de variabilidad significativa o no significativa en las medias de las mediciones entre días, preparaciones y réplicas, asimismo, la evidencia de homocedasticidad o heterocedasticidad, fueron tomados como factores decisivos para la valoración de la capacidad y la normalización del método desarrollado.

Según la guía de referencia<sup>f</sup> se considera aceptable:

- Un **sesgo**[%] en un intervalo entre el ±**15%** del valor consignado (±20% en los niveles cercanos a los límites del rango de trabajo)
- Un  $\operatorname{RSDr}[\%] \leq 15\%$  ( $\leq 20\%$  en los niveles cercanos a los límites del rango de trabajo)
- Un  $\text{RSD}_{\text{D}}[\%] \leq 15\%$  ( $\leq 20\%$  en los niveles cercanos a los límites del rango de trabajo)

# 4.2.3.3. Estabilidad

Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz durante cinco días consecutivos, repitiendo los ciclos de congelamiento y descongelamiento, para evaluar el tiempo viable para obtener datos reproducibles.

Las mezclas y soluciones preparadas para el ensayo de precisión (**M**<sub>i</sub> y **S**<sub>i</sub>) fueron a su vez utilizadas para evaluar la estabilidad. Los esquemas de preparación son expuestos en la **llustración 9** e

Con la medición registrada de cada alícuota en cada día se construyeron gráficos y modelos de regresión. Considerando la posibilidad de un error por el desgaste del horno de grafito se hizo la misma operación con las absorbancias del calibrador más cercano al promedio de las señales de las mezclas de prueba. Los calibradores son soluciones preparadas a diario, inmediatamente antes de efectuar las mediciones.

El modelo de regresión corresponde a una función de primer orden y se espera una pendiente cercana o igual a cero y un el intercepto coincidente con la media de las absorbancias.

Se calcularon los coeficientes de regresión, y se comprobó una hipótesis nula para la pendiente que fue evaluada mediante un test de student como estadístico de prueba

Dado un modelo

 $\mathbf{A} = \mathbf{m} \cdot \mathbf{D} + \mathbf{b}$ Ecuación 97

Donde **m** es la pendiente, **b** el intercepto y **D** el día de la medición (D=1, 2, 3, 4, 5)

Se formulan las siguientes hipótesis

H₀: m = 0 H₀: m ≠ 0

Estadístico de prueba

<sup>&</sup>lt;sup>f</sup> Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen



$$t_{exp} = \frac{m - 0}{S_m} = \frac{m}{S_m}$$
  
Ecuación 98

El valor  $\mathbf{t}_{exp}$  se compara con el valor tabulado  $(\mathbf{t}_{tab})$ ,  $\mathbf{t}_{tab}$  es correspondiente a  $\mathbf{N} - \mathbf{2}$  grados de libertad con un nivel de 99% de confianza ( $\alpha$ =0.01/2)

Se calculó también el valor de probabilidad de rechazar una hipótesis nula verdadera (**p**) en MINITAB<sup>®</sup>.

Se admite que la pendiente no difiere estadísticamente de **0** si  $\mathbf{t}_{exp} < \mathbf{t}_{tab}$  y **p** > 0,05 (95% de confianza). También se observa si el intervalo de confianza incluye la pendiente cero.

Se verificó adicionalmente si existe una correlación significativa entre la señal y el tiempo transcurrido utilizando el coeficiente de correlación (r) bajo las siguientes hipótesis:

H<sub>0</sub>: r = 0 H<sub>a</sub>: r ≠ 0

El estadístico de prueba utilizado es el siguiente

$$\mathbf{t}_{exp} = \frac{|\mathbf{r}| \cdot \sqrt{\mathbf{n} - 2}}{\sqrt{1 - \mathbf{r}^2}}$$

# Ecuación 99

Se contrastó el valor  $\mathbf{t}_{exp}$  con el valor en tabla, con un 95% de confianza ( $\mathbf{t}_{1-\alpha/2; n-2}$ ). Se infiere que no existe una correlación significativa estadísticamente si  $\mathbf{t}_{exp} < \mathbf{t}_{tab}$ 

Las pendientes de las muestras de prueba también fueron contrastadas contra la pendiente del calibrador de referencia, para evaluar si la tendencia de la respuesta de las muestras podría deberse en parte al desgaste del horno de grafito. Para ello se efectuó un test de medias pareadas, sometiendo a prueba una hipótesis nula de que las pendientes no difieren significativamente.

 $H_0: m_1 - m_2 = 0$  $H_a: m_1 - m_2 \neq 0$ 

# 4.2.3.4. Recuperación

La recuperación total se define como la transferencia completa de los analitos de la matriz en la solución que deba medirse. Se determinó la recuperación a partir de una relación de señales entre una muestra biológica fortificada y una misma cantidad de analito en solución acuosa.

Para determinar la recuperación de las muestras fortificadas se asumió que la medición espectrofotométrica representa una absorbancia total  $(A_T)$  de todas las especies químicas que



absorben a las longitudes de onda programada, mayoritariamente aluminio elemental en estado gaseoso. De manera que al comparar la matriz i fortificada con una cantidad x de aluminio patrón con la matriz i sin fortificar, la única diferencia sería x. Esto es representado en las ecuaciones siguientes

$$\begin{split} \mathbf{A}_{T}^{MiF} = \mathbf{A}_{MTX} + \mathbf{A}_{S} + \mathbf{A}_{blk} \\ \text{Ecuación 100} \end{split}$$

$$\label{eq:AT} \begin{split} \mathbf{A}_{T}^{MiO} = \mathbf{A}_{MTX} + \mathbf{A}_{blk} \\ \text{Ecuación 101} \end{split}$$

Donde  $A_T^{MiF}$  es la absorbancia total obtenida de la *i*-mezcla de matriz fortificada, que se compone de la absorbancia propia de los componentes en la matriz biológica ( $A_{MTX}$ ), la absorbancia del patrón agregado a la matriz biológica ( $A_s$ ) y la absorbancia de los interferentes en el solvente ( $A_{blk}$ )

En tanto,  $\mathbf{A}_{T}^{Mio}$  es la absorbancia total de la *i*-mezcla sin fortificar, que se compone de la absorbancia del aluminio en la matriz biológica ( $\mathbf{A}_{MTX}$ ) y la absorbancia proveniente de los interferentes en la mezcla ( $\mathbf{A}_{blk}$ )

La recuperación se calcula a partir de la diferencia entre la alícuota fortificada y la alícuota sin fortificar de cada *i*-mezcla, por medio de la **Ecuación 100** y **la Ecuación 101** 

 $\mathbf{A}_{T}^{MiF} - \mathbf{A}_{T}^{MiO} = (\mathbf{A}_{MTX} + \mathbf{A}_{S} + \mathbf{A}_{blk}) - (\mathbf{A}_{MTX} + \mathbf{A}_{blk}) = \mathbf{A}_{S}$ Ecuación 102

En una solución acuosa, procesada en las mismas condiciones, sujeta a las mismas condiciones ha de producir una absorbancia total con los mismos interferentes exceptuando los contenidos en la matriz biológica. Principalmente sería el resultado de las especies absorbentes provenientes de la solución patrón y del blanco de solvente.

# $A_T^S = A_S + A_{blk}$ Ecuación 103

Para obtener una señal primordialmente influida por el patrón de referencia se resta un blanco de solvente

Con las aproximaciones expresadas en la **Ecuación 102** y la **Ecuación 104** puede efectuarse una estimación de la recuperación



$$\% \mathbf{R} = \frac{\mathbf{A}_{T}^{MiF} - \mathbf{A}_{T}^{MiO}}{\mathbf{A}_{T}^{S} - \mathbf{A}_{blk}} \cdot 100 = \frac{\mathbf{A}_{S}^{M}}{\mathbf{A}_{S}^{S}} \cdot 100$$

# Ecuación 105

Donde  $A_s^M$  es la absorbancia atribuida al patrón de referencia recuperado de la mezcla con matriz biológica; y  $A_s^s$  es la absorbancia atribuida al patrón de referencia de la solución acuosa.

Esta medición de absorbancia permite hacer una relación sin tomar en cuenta las concentraciones de todas las especies, que son sensibles a sus respectivos coeficientes de absorción molar los cuales de hecho serán desconocidos para cada matriz. Aunque  $A_{blk}$  efectivamente no es de una magnitud igual en las mezclas con matriz biológica y la solución acuosa, las medidas de aseguramiento para el experimento se orientaron con énfasis a minimizar su efecto.

# Preparación de soluciones y mezclas

Se prepararon dos muestras de contenidos gástricos añadiendo 100  $\mu$ L de solución estabilizadora (HCl 1% y ácido cítrico 50%) a 1,5 mL de cada espécimen y homogenizando en Vórtex; se dividieron cada una en dos alícuotas de 200  $\mu$ L. Una alícuota de una de las mezclas se fortificó con 200  $\mu$ L de solución de referencia de AlCl<sub>3</sub> (1,001 g/L), para obtener una concentración aproximada de AlCl<sub>3</sub> de 500 mg/L; una alícuota de la segunda mezcla se fortificó con 100  $\mu$ L de la solución de referencia y se completó el volumen con 100  $\mu$ L de solvente (HNO<sub>3</sub> 1% y ácido cítrico 1%) para obtener una concentración aproximada de 250 mg/L; las alícuotas de muestra restantes fueron diluidas con 200  $\mu$ L de solvente. Se prepararon dos soluciones acuosas con 200  $\mu$ L y 100  $\mu$ L de solvente, para obtener concentraciones de 500 mg/L y 250 mg/L. Todas las soluciones y mezclas fueron diluidas y procesadas conforme al esquema mostrado en la **Ilustración 31**. La guía de preparación se esquematiza en la **Ilustración 11** 

ld mezcla	Volumen de matriz (μL)	Volumen de solución de referencia (μL)	Volumen de solvente (μL)	Volumen total de la mezcla (µL)	Concentración atribuida al patrón de referencia
M <sub>1</sub> O	200	0	200	400	0
M <sub>1</sub> F	200	200	0	400	500 mg/L
M <sub>2</sub> O	200	0	200	400	0
M <sub>2</sub> F	200	100	100	400	250 mg/L
<b>S</b> <sub>1</sub>	0	200	200	400	500 mg/L
S <sub>2</sub>	0	100	300	400	250 mg/L

Tabla 14. Guía de preparación de soluciones y mezclas para el ensayo de recuperación del método

# Criterios de evaluación

Según la guía de referencia, se considera aceptable un promedio de recuperación entre el 75% y el 125%.



# Ilustración 11. Esquema de preparación de soluciones y mezclas para el ensayo de recuperación del método





# 4.2.3.5. Límites analíticos: Valor crítico (LC), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Se calcularon los límites de decisión, detección y cuantificación partiendo de experimentos en blancos de solvente.

# Límite de detección

Se determinó el límite de detección partiendo de blancos de solvente y el modelo de calibración, para establecer la concentración calculada máxima que puede ser atribuida al blanco de solvente.

Se efectuó la medición de 6 réplicas de blanco de solvente durante 5 días consecutivos. Con estos datos fue calculada la variabilidad típica en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad intermedia (entre días), esta última tomada como la máxima imprecisión para establecer un límite crítico, expresado como absorbancia. Las desviaciones estándar en condiciones de repetibilidad y precisión entre días fueron calculadas siguiendo el mismo procedimiento que  $M_0$  y  $S_0$  en las pruebas de precisión.

Se calculó el valor de respuesta crítico como el límite superior del intervalo de confianza de la señal

del blanco insertando en la **Ecuación 106** la absorbancia media <sup>A</sup>blk en condiciones de reproducibilidad intermedia (entre días)

$$\mathbf{A}_{\mathbf{LC}} = \overline{\mathbf{A}}_{\mathbf{blk}} + \mathbf{IC}_{\mathbf{A}_{\mathbf{blk}}}$$

Ecuación 106

Donde  $IC_{A_{bk}}$  es el intervalo de confianza estimado por la Ecuación 107 con un riesgo  $\alpha = 0,05$ 

$$IC_{A_{blk}} = t_{1-lpha; gl} \cdot S_{blk}$$
  
Ecuación 107

Donde  $S_{blk}$  es la desviación estándar del blanco en condiciones de reproducibilidad entre días y con varias réplicas-

Se calculó el valor crítico de concentración que corresponde a  $A_{Lc}$  aplicando como función de análisis la **Ecuación 108**, donde los coeficientes utilizados corresponden a la curva de calibración elaborada en condiciones reproducibilidad entre días. El resultado se identificó como  $C_{Lc}$ 

$$\mathbf{C}_{\mathbf{L}\mathbf{C}} = \frac{\left(-\mathbf{b}\mathbf{1} + \sqrt{\mathbf{b}_{1}^{2} - \mathbf{b}_{2}(\mathbf{b}_{0} - \mathbf{A}_{\mathbf{L}\mathbf{C}})}\right)}{2 \cdot \mathbf{b}_{2}}$$

Ecuación 108



Partiendo de  $C_{Lc}$  se obtiene el límite de detección por medio de la **Ecuación 109**, estableciendo un riesgo  $\beta = 0.05$ 

$$\mathbf{C}_{\mathbf{L}_{\mathbf{D}}} = \mathbf{C}_{\mathbf{L}_{\mathbf{C}}} + \frac{\mathbf{t}_{(\mathbf{n}-1;1-\beta)}}{2 \cdot \mathbf{b}_{2} \cdot \mathbf{C}_{\mathbf{L}_{\mathbf{C}}} + \mathbf{b}_{1}} \cdot \sqrt{\mathbf{S}_{\mathbf{R}_{(\text{total})}}^{2}}$$

Ecuación 109

$$\label{eq:cond} \text{Donde} ~~ s^2_{\textbf{R}_{(total)}} = s^2_{\textbf{A}(\textbf{R})} + s^2_{\textbf{m}} + s^2_{\hat{\textbf{A}}(\textbf{C}_{Lc})}$$

# Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se define como la concentración mínima ( ${}^{\mathbf{L}_{Q}}$ ) que puede ser determinada con una incertidumbre relativa especificada de los resultados del 33,3% (significancia: 99%),

Para calcular el límite de cuantificación se requirió del factor K que se relaciona con el resultado máximo aceptable de la incertidumbre relativa. Una incertidumbre relativa de 33,3% equivale a un factor k = 3

La aproximación del límite de cuantificación se obtuvo multiplicando el valor crítico de concentración ( $C_{Lc}$ ) por el factor k

$$C_{L_o} = \mathbf{k} \cdot C_{L_o}$$

# Ecuación 110

El límite de detección se considera adecuado en tanto que no sobrepase el límite de decisión (significancia 1%). La estimación del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) se detalla en los ensayos de selectividad.

El límite de cuantificación se considera aceptable en tanto no supere el límite inferior nominal del rango de calibración.

# 4.2.3.6. Selectividad

La selectividad del método desarrollado se definió como la habilidad del mismo para discriminar entre muestras negativas verdaderas (verdaderos negativos o vn) y positivas verdaderas (verdaderos positivos o vp) en base a un límite de decisión. La determinación cuantitativa de aluminio elemental en contenido gástrico permite estratificar las muestras en dos categorías: "muestras positivas" y "muestras negativas". Es así que el método de análisis cuantitativo se convierte al final en una prueba cualitativa. Las muestras fueron clasificadas en tres grupos:

**VERDADEROS NEGATIVOS (VN2):** muestras cuya historia médico-legal y las pruebas realizadas indican que la causa de muerte fue ajena a intoxicaciones por ingestión de fosfuro de aluminio



**VERDADEROS POSITIVOS (VP):** muestras cuya historia médico-legal afirma que la causa de muerte fue puntualmente una intoxicación por ingestión de tabletas de fosfuro de aluminio, sumado a esto las pruebas realizadas confirman este hecho

**POSIBLES FALSOS NEGATIVOS:** muestras cuya historia médico-legal refieren ingesta de fosfuro de aluminio pero los ensayos de laboratorio dieron resultados negativos. Existe en estas muestras una probabilidad de falsos negativos clínicos o analíticos, incluso debido al procedimiento de recolección y preservación preanalítica. Estas muestras únicamente fueron contrastadas sin ser referentes para establecer el límite de decisión.

Para evaluar la selectividad del método fue necesario primero establecer un límite de decisión ( $CC\alpha$ ) por un método estocástico, como parte de la etapa de desarrollo.

# Validación del límite de decisión

Para validar el límite de decisión fueron seleccionadas seis muestras independientes, identificadas como grupo **VN2** sin relación con las utilizadas en los ensayos para el cálculo de límite de decisión. Estas muestras tienen una historia médico legal en la que se descarta la ingesta de fosfuro de aluminio.

De estos especímenes tres fueron acidificados con 100  $\mu$ L de solución de ácido clorhídrico (3 M) con el objeto de incluir un efecto de especiación del aluminio, ya que el pH de los contenidos estomacales tiende a incrementar durante el almacenamiento.

Estas muestras fueron dividas en dos alícuotas cada una. Una alícuota de cada espécimen fue fortificada con distintas cantidades de formulación de fosfuro de aluminio, elaborando un conjunto de muestras positivas sintéticas; sumado a estas se incluyeron cuatro especímenes reales clasificados como verdaderos positivos (VP).

Las alícuotas restantes se dejaron sin alteración, para conformar un grupo de muestras negativas. Este grupo fue identificado como  $VN_2$  (verdaderos negativos de cotejamiento)

ID muestra	Volumen De ácido clorhídrico 3M	Volumen inicial de alícuota	Cantidad adicionada de AIP en tableta (pulverizado)	ID alícuota	Volumen final de alícuota*			
M1	100 μL	1,0 mL	24,8 mg	MP1	1,5 mL			
		1,5 mL		MN1	1,5 mL			
M2		1,0 mL	28,1 mg	MP2	1,5 mL			
		1,5 mL		MN2	1,5 mL			
M3	100 μL	1,0 mL	45,6 mg	MP3	1,5 mL			
		1,5 mL		MN3	1,5 mL			
M4		1,0 mL	45,6 mg	MP4	1,5 mL			
		1,5 mL		MN4	1,5 mL			
M5	100 μL	1,0 mL	70,2 mg	MP5	1,5 mL			

# Tabla 15. Guía de preparación de muestras positivas y muestras negativas verdaderas



ID muestra	Volumen De ácido clorhídrico 3M	Volumen inicial de alícuota	nen Cantidad ial adicionada de cuota AIP en tableta (pulverizado)		Volumen final de alícuota*
		1,5 mL		MN5	1,5 mL
M6 1,0 mL		1,0 mL	77,1 mg	MP6	1,5 mL
1,5 mL MN6 1,5 mL					
*el volumen de las alícuotas fue completado con el mismo espécimen					

Estos juegos de muestras fueron categorizados *a priori* como verdaderos positivos y verdaderos negativos.

Las muestras fueron tratadas como se indica en el **llustración 31** y se efectuaron las mediciones espectrofotométricas para calcular la concentración de aluminio elemental de cada una.

Se repitió el experimento de simulación descrito anteriormente, utilizando la **Ecuación 42**, con el grupo  $VN_2$ . En esta simulación se programó el software para identificar y contabilizar las concentraciones por encima del límite de decisión. De igual forma se procesaron las muestras positivas verdaderas (VP) con la diferencia de que se programó el límite de decisión como límite inferior de la población. Las muestras fueron de esta manera identificadas *a posteriori* como "negativas" o "positivas" en base al límite de decisión, generando una población del al menos 10000 datos de cada grupo.

Cotejando los datos experimentales contra el conocimiento previo se construyó una tabla de contingencia donde se contrastan: el número de muestras negativas verdaderas que son identificadas como tales (vn), siendo que la concentración calculada es menor al límite de decisión; el número de muestras negativas verdaderas que son identificadas como positivas al superar el límite de decisión y son clasificadas como falsos positivos (fp); el número de muestras positivas verdaderas que se identifican de esta manera (vp), cuyas concentraciones sobrepasan al límite de decisión, siguiendo el procedimiento de ensayo; y el número de muestras positivas verdaderas cuyas concentraciones calculadas fueron menores al límite de decisión, siendo estas muestras clasificadas como falsos negativos (fn)

<b>č</b> 1 ,		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
		Datos a posteriori (usando CCα)			
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL	
Datos a priori (preparación/ historia médico legal)	NEGATIVO	vn	fp	vn + fp	
	POSITIVO	fn	vp	fn + vp	
	TOTAL	vn + fn	fp + vp	Т	

Tabla 16. Tabla de contingencia para contr	atar datos <i>a priori</i> cont	tra información <i>a po</i>	steriori
--------------------------------------------	---------------------------------	-----------------------------	----------

Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes parámetros cualitativos de desempeño relacionados de la selectividad:

# Índice de falsos positivos



La probabilidad de que una muestra de prueba *a priori* negativa, sea clasificada como positiva por el método

$$r_{fp} = \frac{fp}{vp + fp}$$
  
Ecuación 111

# Índice de falsos negativos

La probabilidad de que una muestra de prueba *a priori* positiva, sea clasificada como positiva por el método

$$r_{fn} = rac{fn}{vp + fn}$$
Ecuación 112

# Sensitividad [%]

La probabilidad, para una concentración dada, de que el método clasifique una muestra positiva verdadera como tal, expresada en términos porcentuales

sensitivid ad[%] = 
$$\frac{vp}{vp + fn} \cdot 100$$

# Ecuación 113

# Especificidad [%]

La probabilidad, para una concentración dada, que el método clasifique una muestra negativa verdadera como tal, expresada en términos porcentuales

$$\text{Especifici dad}[\%] = \frac{\text{vn}}{\text{vn} + \text{fp}} \cdot 100$$

# Ecuación 114

# Eficiencia

La capacidad del método para clasificar muestras negativas y positivas verdaderas como tales, expresada como una probabilidad en términos porcentuales

Eficiencia [%] = 
$$\frac{\mathbf{vn} + \mathbf{vp}}{\mathbf{T}} \cdot 100$$

# Ecuación 115

# Criterios de evaluación

Se considera que el método tiene una selectividad adecuada con una probabilidad de falsos positivos menor al 5% y un riesgo de falsos negativos menor al 5%. La sensitividad y especificidad deben ser mayores o iguales al 90%, y la eficiencia no menor al 95%
# **5. RESULTADOS**

# 5.1. Pruebas de desarrollo

## 5.1.1. Pruebas experimentales previas

## Selección de longitud de onda

Realizados los ensayos se obtuvieron como resultados los siguientes:

Código experimental	Ancho de ranura	Longitud de onda	CALIBRACIÓN AUTOMÁTICA			
EXP1.1.1	0.2nm	309.3nm	SI			
EXP1.1.2	0.2nm	396.2nm	NO CALIBRADO			
EXP1.1.3	0.5nmR	309.3nm	SI			
EXP1.1.4	0.5nmR	396.2nm	NO CALIBRADO			
EXP1.1.5	0.5nm	309.3nm	SI			
EXP1.1.6	0.5nm	396.2nm	NO CALIBRADO			

Tabla 17. Diseño experimental y resultado de la calibración automática (realizada por el instrumento	abla 17. Diseño experimental y resultado de la calibración automática (realizada por el instrumento)
------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Tabla 18. Factores de curvatura y coeficientes de calidad de la curva calculados

C (µg/L)	EXP 1.1.1	EXP 1.1.2	EXP 1.1.3	EXP 1.1.4	EXP 1.1.5	EXP 1.1.6
0	0.1754	0.5672	0.2418	0.3685	0.2245	0.2777
50	0.2872	0.2657	0.3654	0.2685	0.5597	0.4165
150	0.6905	0.551	0.6416	0.7076	0.7628	0.6488
300	0.9073	1.151	0.8974	1.1736	0.9976	0.8628
500	1.0833	1.6087	1.0806	1.7767	1.1459	1.0722
Q	0.0361	-0.6044	-0.0666	-0.4506	0.1005	-0.1200
%QC	12.41	47.64	3.02	33.49	20.57	2.90

A 396,2 nm se observan curvaturas que tienden a ser convexas en tanto los mejores coeficientes fueron encontrados a 309,3 nm (excepto en el experimento 1.1.6). Considerando ambos aspectos y que el rango de interés del analito en la muestra se espera es alto, se prefiere desarrollar el método con una longitud de onda de 309,3 nm

## Rango de trabajo

Al realizarse los ensayos el primero conjunto de calibradores no proporcionó resultados aceptables. Esto indica que el Laboratorio Químico Toxicológico no tiene capacidad de efectuar determinaciones a bajas concentraciones.

De los otros conjuntos se obtuvieron los siguientes resultados:



	ABSORBANCIAS				
Concentración (µg/L)	EXP1.3.1	EXP1.3.2	EXP13.3	EXP1.3.4	
10	-0.0275	0.0495	0.0606	0.0474	
20	0.252	0.0999	0.1057	0.0917	
50	0.1464	0.2216	0.2205	0.2071	
80	0.2558	0.3268	0.3131	0.3096	
100	No calibra	0.3866	0.3637	0.3657	
Q <sub>EXP</sub>	0.15826	0.02120	0.05396	0.00754	

#### Tabla 19. Absorbancias entre 10 y 100 microgramos por litro

#### Tabla 20. Absorbancias entre 100 y 1000 microgramos por litro

	ABSORBANCIAS				
Concentración (µg/L)	EXP1.4.1	EXP1.4.2	EXP1.4.3	EXP1.4.4	
100	0.5072	0.4764	0.5159	0.4624	
200	0.7627	0.7282	0.7027	0.6625	
500	1.0464	1.0344	0.9977	0.9641	
800	1.2536	1.2125	1.1513	1.134	
1000	1.3555	1.3141	1.2745	1.2313	
Q <sub>EXP</sub>	0.27841	0.32879	0.24212	0.29371	

Se demostró capacidad para efectuar ensayos en un rango de concentración de 10  $\mu$ g/L a 1000  $\mu$ g/L.

Se decide efectuar el desarrollo del ensayo dentro del segundo rango de trabajo, al ser demostrado una factibilidad para operar en esos niveles de concentración y estimando una mayor proximidad con el rango esperado en las muestras reales.

## Ancho de ranura en rendija del monocromador

Se hicieron barridos espectrales variando el ancho de ranura de la rendija del monocromador



#### Ilustración 12 Barrido espectral con ancho de ranura de 0,5 nm

Ilustración 13 Barrido espectral con ancho de ranura de 0,2 nm



#### MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA AL ANÁLISIS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO

**Carlos Iván Roque** 



Ilustración 14. Barrido espectral con ancho de ranura de 0,5 nmR



Se seleccionaron para el estudio experimental 0,2 nm y 0,5 nm.

## 5.1.2. Optimización del método sobre asintotismo

Tabla 21. Absorbancias obtenidas en el experimento 1.5								
	ABSORBANCIAS							
	Cur	vas de adi	ición patro	ón				
Concentración (µg/L)	1.5.1	1.5.2	1.5.3	1.5.4	1.5.5	1.5.6	1.5.7	1.5.8
0	0.2677	0.2287	0.1722	0.3162	0.3905	0.3347	0.2241	0.408
1	1.0186	1.0623	1.0091	1.1912	1.4717	1.2048	1.207	1.2305
2	1.3507	1.3013	1.4381	1.5215	1.5509	1.4924	1.5188	1.5573
3	1.6308	1.6474	1.8041	1.7773	1.8352	1.7148	1.8097	1.7315
4	1.805	1.6843	2.0244	1.8748	1.9688	1.8152	2.0968	1.9283
R <sup>2</sup>	0.9917	0.9815	0.9956	0.9878	0.9308	0.9817	0.9759	0.9808
BO	0.3050	0.2732	0.2045	0.3628	0.4980	0.3890	0.2999	0.4622
B1	0.7131	0.7743	0.8203	0.8359	0.8349	0.8056	0.8384	0.7553
B2	-0.0861	-0.1062	-0.0926	-0.1164	-0.1207	-0.1146	-0.1009	-0.1003
QEXP	0.4671	0.6073	0.4115	0.6286	0.6859	0.6604	0.4641	0.5663
%QC	11.86	16.78	14.50	12.64	24.21	14.10	26.36	12.21

abla 21. Absorbancias obtenidas en el experimento 1.5

	Q exp	Predicción de Q	%QC	Predicción %QC
1.5.1	0.4671	0.4734	11.86	12.20
1.5.2	0.6073	0.6009	16.78	16.44
1.5.3	0.4115	0.4052	14.50	14.15
1.5.4	0.6286	0.6350	12.64	12.98
1.5.5	0.6859	0.6795	24.21	23.87
1.5.6	0.6604	0.6668	14.10	14.44
1.5.7	0.4641	0.4704	26.36	26.71
1.5.8	0.5663	0.5600	12.21	11.87
MIN	0.4115	0.4052	11.9	11.8685
MAX	0.6859	0.6795	26.4	26.7078
COEFICIENTES DE	E SENSIBILIDAD [	DE LAS MATRIZ EXPE	RIMENTAL	Y SIGNIFICANCIA
	1	ASOCIADA		
COEFICIENTES	Q	%Pq	%QC	%Р <sub>QC100</sub>
b0	0.5614	99.28	16.5827	98.68
b1	-0.0328	87.79	-2.6387	91.74
b2	0.0438	90.81	0.1547	26.87
b3	-0.0543	92.57	2.6500	91.77
b12	-0.0352	88.61	0.2215	36.38
b13	-0.0351	88.57	-3.4169	93.60
b23	0.0256	84.47	-1.9	89.08

Al realizar el cálculo matricial para estimar el valor de los coeficientes b2, b1, b0 y sus interacciones en relación a Q y %QC respectivamente se obtienen los siguientes resultados

Con los coeficientes del modelo experimental se calcularon las predicciones para Q y %QV

	Q exp	Predicción de Q	%QC	Predicción %QC
1.5.1	0.4671	0.4734	11.86	12.20
1.5.2	0.6073	0.6009	16.78	16.44
1.5.3	0.4115	0.4052	14.50	14.15
1.5.4	0.6286	0.6350	12.64	12.98
1.5.5	0.6859	0.6795	24.21	23.87
1.5.6	0.6604	0.6668	14.10	14.44
1.5.7	0.4641	0.4704	26.36	26.71
1.5.8	0.5663	0.5600	12.21	11.87
MIN	0.4115	0.4052	11.9	11.8685
MAX	0.6859	0.6795	26.4	26.7078

Tabla 22. Predicciones de Q y %QC para cada experimento

Se graficó la relación de los factores experimentales y la curvatura. Serían consideradas las mejores combinaciones las que se aproximen al centro 0 del gráfico









Se elaboraron gráficos de superficie de respuesta de Q y %QC en función de los experimentos



El gráfico sugiere que en los experimentos 1.5.5 en adelante incrementa el riesgo de valores %QC inaceptables y a medida que la curvatura sea reducida.



Del análisis realizado se selecciona la combinación 1.5.1 como la más adecuada para el propósito establecido.

## 5.1.3. Evaluación del efecto de matriz

Se elaboraron curvas de adición patrón (AE) con seis especímenes de contenido gástrico diferentes y fueron cotejadas con una curva de calibración en solución acuosa (EA). Se obtuvieron los siguientes resultados

	DATOS EXPERIMENTALES						
A <sub>blk</sub>	0.1387		Abso	orbancias de a	lícuotas sin fo	rtificar	
Concentración de patrón adicionado	Patrón acuoso	Muestra Biológica 1	Muestra Biológica 2	Muestra Biológica 3	Muestra Biológica 4	Muestra Biológica 5	Muestra Biológica 6
CADD	EA	M10	M2O	M30	M40	M50	M6O
0	0.1863	0.1774	0.0939	0.1801	0.1784	0.1104	0.0997
10	0.2587	0.2836	0.2632	0.3068	0.2535	0.2633	0.2541
20	0.3545	0.3645	0.3515	0.4083	0.3883	0.3685	0.3629
30	0.4127	0.4507	0.4359	0.4525	0.4636	0.4301	0.4160
40	0.4720	0.4789	0.5152	0.4932	0.4865	0.4763	0.5008
b2	-0.00005	-0.00011	-0.00013	-0.00016	-0.00012	-0.00018	-0.00014
b1	0.00908	0.01201	0.01541	0.01427	0.01295	0.01633	0.01521
b0	0.18265	0.17547	0.10261	0.18104	0.16539	0.11329	0.10604
		Absorbancias de alícuotas fortificadas					
		Absorba	ncias de alícuo	otas fortificada	as		Absorbancia
Concentración de patrón adicionado	Muestra Biológica 1	Absorba Muestra Biológica 2	ncias de alícuo Muestra Biológica 3	otas fortificada Muestra Biológica 4	as Muestra Biológica 5	Muestra Biológica 6	Absorbancia media (todas las muestras)
Concentración de patrón adicionado CADD	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b>	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b>	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b>	otas fortificada Muestra Biológica 4 <b>M4F</b>	as Muestra Biológica 5 <b>M5F</b>	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b>	Absorbancia media (todas las muestras) (AE)
Concentración de patrón adicionado <b>CADD</b> 0	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b> 0.2569	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478	otas fortificada Muestra Biológica 4 <b>M4F</b> 0.2513	AS Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835
Concentración de patrón adicionado CADD 0 10	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b> 0.2569 0.3659	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486 0.3475	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478 0.3479	otas fortificada Muestra Biológica 4 <b>M4F</b> 0.2513 0.3467	AS Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900 0.2826	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679 0.2906	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835 0.3005
Concentración de patrón adicionado CADD 0 10 20	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b> 0.2569 0.3659 0.4402	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486 0.3475 0.4096	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478 0.3479 0.3975	Muestra Biológica 4 <b>M4F</b> 0.2513 0.3467 0.4374	AS Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900 0.2826 0.3834	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679 0.2906 0.3883	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835 0.3005 0.3917
Concentración de patrón adicionado CADD 0 10 20 30	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b> 0.2569 0.3659 0.4402 0.4767	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486 0.3475 0.4096 0.4628	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478 0.3479 0.3975 0.4786	0.3467 0.4881	AS Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900 0.2826 0.3834 0.4378	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679 0.2906 0.3883 0.4572	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835 0.3005 0.3917 0.4542
Concentración de patrón adicionado CADD 0 10 20 30 40	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b> 0.2569 0.3659 0.4402 0.4767 0.5125	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486 0.3475 0.4096 0.4628 0.5017	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478 0.3479 0.3975 0.4786 0.5329	0.4374 0.4374 0.5496	AS Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900 0.2826 0.3834 0.4378 0.5298	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679 0.2906 0.3883 0.4572 0.5220	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835 0.3005 0.3917 0.4542 0.5083
Concentración de patrón adicionado CADD 0 10 20 30 40 b2	Muestra Biológica 1 <b>M1F</b> 0.2569 0.3659 0.4402 0.4767 0.5125 -0.00013	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486 0.3475 0.4096 0.4628 0.5017 -0.00009	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478 0.3479 0.3975 0.4786 0.5329 -0.00004	Muestra   Biológica   4   M4F   0.2513   0.3467   0.4374   0.4381   0.5496   -0.00008	AS Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900 0.2826 0.3834 0.4378 0.5298 -0.00003	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679 0.2906 0.3883 0.4572 0.5220 -0.00010	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835 0.3005 0.3005 0.3917 0.4542 0.5083 -0.00011
Concentración de patrón adicionado CADD 0 10 20 30 40 b2 b1	Muestra Biológica 1 M1F 0.2569 0.3659 0.4402 0.4767 0.5125 -0.00013 0.01148	Absorba Muestra Biológica 2 <b>M2F</b> 0.2486 0.3475 0.4096 0.4628 0.5017 -0.00009 0.00990	ncias de alícuo Muestra Biológica 3 <b>M3F</b> 0.2478 0.3479 0.3975 0.4786 0.5329 -0.00004 0.00873	Muestra   Biológica   4   M4F   0.2513   0.3467   0.4374   0.4881   0.5496   -0.00008   0.01046	As Muestra Biológica 5 <b>M5F</b> 0.1900 0.2826 0.3834 0.4378 0.5298 -0.00003 0.00971	Muestra Biológica 6 <b>M6F</b> 0.1679 0.2906 0.3883 0.4572 0.5220 -0.00010 0.01288	Absorbancia media (todas las muestras) (AE) 0.1835 0.3005 0.3917 0.4542 0.5083 -0.00011 0.01244

### Tabla 23. Mediciones espectrofotométricas de Aluminio en muestras biológicas y solución acuosa

## CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ADICIÓN PATRÓN Y CALIBRACIÓN ACUOSA EN SEIS MUESTRAS BIOLÓGICAS INDEPENDIENTES









#### Ilustración 20 Curvas de calibración de adición patrón y en solución acuosa MUESTRA BIOLÓGICA 3









#### Ilustración 22 Curvas de calibración de adición patrón y en solución acuosa MUESTRA BIOLÓGICA 5



Ilustración 23 Curvas de calibración de adición patrón y en solución acuosa MUESTRA BIOLÓGICA 6



## **Pruebas estadísticas**

Se efectuó una prueba de Fisher para las varianzas residuales de cada curva en contraste a la curva de calibración acuosa



	S <sub>A</sub> <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>		S <sub>A</sub> -	F <sub>exp</sub>
EA	9.5865E-05		A <sub>media</sub> (AE)	1.9008E-05	5.043
M10	0.00011644	1.215	M1F	6.9343E-05	1.382
M2O	0.00033183	3.461	M2F	3.3233E-05	2.885
M30	7.625E-05	1.257	M3F	0.00016869	1.760
M40	0.00074226	7.743	M4F	6.4964E-05	1.476
M50	5.6313E-05	1.702	M5F	0.00018043	1.882
M6O	0.00036667	3.825	M6F	2.7642E-05	3.468
F <sub>tabla</sub> 19.0					

## Tabla 24. Pruebas de contrastes de significancia para las varianzas residuales de las curvas de adición patrón

La prueba de homogeneidad para las varianzas residuales demuestra que la matriz no tiene un efecto significativo sobre la variabilidad del sistema de mediciones

Se realizó el contraste de la magnitud de la señales entre una solución acuosa y las matrices biológicas. Para ello se trataron los seis sistemas de adición patrón como una sola curva de calibración











Se verificó si la regresión de las mediciones obtenidas por adición estándar (AE) contra las obtenidas con soluciones estándar acuosas (EA) tiene un modelo lineal de primer orden, donde la pendiente es igual a 1 y el intercepto es igual a 0

Dado el modelo:  $\mathbf{A}_{AE} = \mathbf{m} \cdot \mathbf{A}_{EA} + \mathbf{a}$ Las hipótesis para la pendiente son:  $H_0: m = 1$ H<sub>a</sub>: m ≠ 1

Las hipótesis para el intercepto son:  $H_0: a = 0$ H<sub>a</sub>: a ≠ 0

abla 25. Cálculos de regresión y comprobación de supuestos						
Absorbancia EA	Absorbancia AE	S <sub>a/m</sub> <sup>2</sup>	0.00180			
0.1863	0.1835	S <sub>a/m</sub>	0.04238			
0.2587	0.3005	H0: m = 1				
0.3545	0.3917	t <sub>exp</sub> (m)	0.6000			
0.4127	0.4542	t <sub>tab</sub> (m)	7.4533			
0.4720	0.5083	p <sub>exp</sub> (m)	0.5908			
m	1.1103	H0: a = 0				
а	-0.0064	t <sub>exp</sub> (a)	-0.0984			
S <sub>m</sub>	0.18389	t <sub>tab</sub> (a)	7.4533			
S <sub>a</sub>	0.06478	p <sub>exp</sub> (a)	0.9278			

Las pruebas estadísticas permiten inferir que existe una relación lineal entre ambas señales y por lo tanto el efecto de la matriz biológica es poca significativa. Pero al graficar los resultados y realizar un examen de los residuales proveyeron nuevos elementos para considerar un efecto sistemático de la matriz sobre la medición.



Ilustración 26. Modelos de correlación de Absorbancias de patrones acuosos vrs. Adición patrón.

Al realizar el análisis de residuales se verifica que el modelo lineal no es más adecuado que otro modelo, como un modelo cuadrático. El gráfico de residuos en función de la respuesta muestra una tendencia típica de correlaciones no lineales.

Ilustración 27



FOSFURO DE ALUMINIO Carlos Iván Roque



## Ilustración 28



Se efectuó un test de Mandel para comprobar el modelo que explica con más precisión el efecto de matriz en la magnitud de la señal de absorbancia.

Modelo	lineal	VP	40.1408
S <sub>a/m</sub> <sup>2</sup>	0.00180	F <sub>tab</sub> (95%)	18.51
Modelo	cuadrático	р	0.0240
S <sub>A/c</sub> <sup>2</sup>	0.00013		<0,05

Con un 95% de confianza se rechaza la hipótesis de que el efecto de la matriz biológica en la variabilidad de la magnitud de la absorbancia se explica mejor por un modelo lineal simple en contraste a un modelo cuadrático.

Una tendencia no lineal pero sí proporcional indica un error sistemático por efecto de la matriz. Se procedió a desarrollar un modelo que permita el ajuste por efecto de matriz.

## Modelo de ajuste por efecto de matriz

Se estimó el factor de ajuste por efecto de matriz (factor de recuperación) en cada nivel de adición, para cada curva, relacionando la sensitividad del sistema de adición patrón con la sensitividad del sistema de calibración acuosa del respectivo nivel. La **Tabla 27** muestra los datos y su



procesamiento para obtener una serie de factores de corrección aplicando la **Ecuación 31**. Ploteando los factores de corrección combinados de una serie de seis especímenes independientes en función de la concentración de analito adicionado se obtiene un modelo que se influye por la mayor cantidad de variantes provocadas por la matriz biológica que fue posible. Se construyó entonces una curva de ajuste en condiciones de reproducibilidad por variación del efecto de matriz (muestras independientes). El modelo resultante se muestra en la **Ecuación 116** 

## $FR = -0.00022276 \cdot C^2 - 0.00852853 \cdot C + 1.36764562$ Ecuación 116. Modelo de regresión para calcular el ajuste por efecto de matriz

Este modelo será aplicado insertando en el mismo la concentración (C) calculada por la **Ecuación 85**, antes de introducir el factor de dilución (FD) y su factor de ajuste ( $F_D$ ). Se obtiene así el factor de ajuste por efecto de matriz que se introduce en la función de análisis para completar la operación.

En la **Ilustración 29** se muestra la curva de regresión obtenida, con su intervalo de predicción calculado con un 95% de confianza. La construcción de este gráfico con muestras independientes permitiría abracar la mayor variabilidad posible, aún así se verifico que el sistema es homocedástico



Ilustración 29. Curva de regresión de factores de ajuste por efecto de matriz, con su corredor de errores

CADD	EA	M10	M20	M30	M40	M50	M60	M1F	M2F	M3F	M4F	M5F	M6F	A <sub>media</sub> (AE)
0	0.1863	0.1774	0.0939	0.1801	0.1784	0.1104	0.0997	0.2569	0.2486	0.2478	0.2513	0.19	0.1679	0.1835
10	0.2587	0.2836	0.2632	0.3068	0.2535	0.2633	0.2541	0.3659	0.3475	0.3479	0.3467	0.2826	0.2906	0.3005
20	0.3545	0.3645	0.3515	0.4083	0.3883	0.3685	0.3629	0.4402	0.4096	0.3975	0.4374	0.3834	0.3883	0.3917
30	0.4127	0.4507	0.4359	0.4525	0.4636	0.4301	0.416	0.4767	0.4628	0.4786	0.4881	0.4378	0.4572	0.4542
40	0.4720	0.4789	0.5152	0.4932	0.4865	0.4763	0.5008	0.5125	0.5017	0.5329	0.5496	0.5298	0.522	0.5083
2.b2	-0.00009	-0.00022	-0.00026	-0.00033	-0.00023	-0.00037	-0.00028	-0.00026	-0.00018	-0.00009	-0.00015	-0.00007	-0.00021	-0.00022
b <sub>1</sub>	0.00908	0.01201	0.01541	0.01427	0.01295	0.01633	0.01521	0.01148	0.00990	0.00873	0.01046	0.00971	0.01288	0.01244
COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD (PENDIENTES E)														
0	0.0091	0.0120	0.0154	0.0143	0.0129	0.0163	0.0152	0.0115	0.0099	0.0087	0.0105	0.0097	0.0129	0.0124
10	0.0082	0.0099	0.0128	0.0110	0.0106	0.0127	0.0124	0.0089	0.0081	0.0079	0.0089	0.0090	0.0108	0.0102
20	0.0073	0.0077	0.0102	0.0077	0.0083	0.0090	0.0096	0.0062	0.0062	0.0070	0.0074	0.0083	0.0087	0.0080
30	0.0063	0.0055	0.0075	0.0044	0.0059	0.0053	0.0069	0.0036	0.0044	0.0062	0.0058	0.0077	0.0067	0.0058
40	0.0054	0.0034	0.0049	0.0012	0.0036	0.0016	0.0041	0.0010	0.0025	0.0053	0.0043	0.0070	0.0046	0.0036
	FA	CTOR DE AJI	JSTE POR EF	ECTO DE MA	ATRIZ (Relac	ión de pend	ientes FR=E,	AE/EEA)						
0	1.000	1.323	1.697	1.572	1.426	1.799	1.676	1.265	1.090	0.961	1.152	1.070	1.419	1.37
10	1.000	1.207	1.565	1.346	1.299	1.550	1.522	1.084	0.987	0.964	1.092	1.106	1.324	1.25
20	1.000	1.062	1.400	1.064	1.139	1.239	1.329	0.857	0.857	0.966	1.017	1.151	1.206	1.11
30	1.000	0.875	1.187	0.701	0.934	0.838	1.081	0.566	0.690	0.970	0.921	1.209	1.054	0.92
40	1.000	0.625	0.902	0.215	0.659	0.303	0.750	0.176	0.466	0.974	0.792	1.287	0.850	0.67

## Tabla 27. Datos para el cálculo modelo de ajuste por efecto de matriz

## Tabla 28. Componentes de la variabilidad del sistema

CADD	F <sub>pred</sub>	S <sub>F(R)</sub> <sup>2</sup>	S <sub>Fj(cx)</sub> <sup>2</sup> media	S <sub>m</sub> <sup>2</sup>	S <sub>total</sub> <sup>2</sup>	IC <sub>Fpred</sub>	LIF	LSF	Sb2
0	1.3676	0.0001	0.000131	0.074055	0.074271	0.8621	0.5055	2.2298	8.53405E-08
10	1.2601	0.0001	0.000117	0.047163	0.047365	0.6885	0.5716	1.9485	Sb1
20	1.1080	0.0001	0.000096	0.029178	0.029359	0.5420	0.5659	1.6500	3.33811E-06
30	0.9113	0.0001	0.000070	0.040735	0.040889	0.6397	0.2716	1.5510	Sb0
40	0.6701	0.0001	0.000038	0.108512	0.108635	1.0426	-0.3726	1.7127	2.37578E-05
			<b>F</b> <sub>EXP</sub>	1.463		RSDr(C	<sub>media</sub> )[%]	0.0077	
				$\mathbf{F}_{TAB(\alpha=0,01)}$	10.967		RSD <sub>R</sub> (C	<sub>nedia</sub> ) <b>[%]</b>	0.0077

## 5.1.4. Evaluación del efecto de la dilución

Se determinó una función de ajuste para corregir la no linealidad de las diluciones previas, no incluidas en el sistema de calibradores.

El factor de corrección por dilución se calculó por medio de un modelo polinomial de segundo orden que correlaciona este factor de ajuste con el factor de dilución teórico. Se prepararon las diluciones de prueba conforme al procedimiento expuesto y se registraron las absorbancias. Se desarrolló un modelo lineal simple y un modelo cuadrático como alternativo. Se verificaron los supuestos para el modelo de regresión lineal simple (RLS). Los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 29** 

Tabla 29. Datos experime	ntales
--------------------------	--------

<b>FD</b> <sub>TEORICO</sub>	Absorbancia (A/s)	FD <sub>exp</sub>	pFD	LogA
5	1.8733	1.00	-0.6990	0.2726
500	1.1731	1.60	-2.6990	0.0693
5000	0.3706	5.05	-3.6990	-0.4311
16000	0.3152	5.94	-4.2041	-0.5014

Evaluación de modelo de regresión de	logaritmos LogA y pFD			
Modelo lineal (logaritmos)		H <sub>0</sub> : x = 1		
LogA = xpFD + Logk		t <sub>exp</sub> (x)	13.3	
LogA = 0.23001pFD + 0.50219	$R^2 = 0.8877$	t <sub>tab</sub> (x)	4.3	
x	0.5022	p <sub>exp</sub> (x)	0.0056	
k	0.2300			
S <sub>k/x</sub>	0.1552	H <sub>0</sub> : Log k = 0		
S <sub>x</sub>	0.05785	t <sub>exp</sub> (k)	2.78	
S <sub>k</sub>	0.18093	t <sub>tab</sub> (k)	4.30	
		p <sub>exp</sub> (k)	0.1090	



Ilustración 30. Comparación de modelos

Se determina que la variable x difiere significativamente de 1 y por tanto hay una influencia proporcional del factor de dilución sobre la medición. En tanto que Log k no difiere estadísticamente de 0, por lo que puede inferirse que k es aproximadamente igual a 1.



En base a las pruebas se define una función predictiva de corrección por efecto de dilución, correlacionando el factor de dilución calculado teóricamente (**Ecuación 35**) contra el factor empírico, estimado de datos experimentales (**Ecuación 33**). La forma gráfica de esta relación se obtiene por medio de MINITAB<sup>®</sup> y se muestran también sus intervalos de predicción (para **F**<sub>exp</sub>) y de confianza de regresión (para **FD**)



El sistema obtenido tiene un comportamiento asintótico, donde a partir de un punto la sensitividad es prácticamente nula aun en diluciones extremas. Un modelo de tercer orden (cúbico) resultaría de difícil comprensión en la práctica rutinaria, de manera que se optó por un modelo de segundo orden el cual se mostró apropiado. Los intervalos de predicción y de regresión se ensanchan excesivamente en diluciones con factores por encima de los 4000 unidades aproximadamente, por lo que implicaría un riesgo elevado aplica esta función ante factores de dilución demasiado altos; de hecho se desaconseja aplicar factores de dilución mayores a 1000 en espectrofotometría de absorción atómica. En este caso, el método establece fraccionar la dilución en dos pasos sucesivos para operar con errores de menor magnitud.

Se determina como función de ajuste la siguiente expresión

$$\mathbf{F}_{\mathbf{D}} = -5.4 \cdot 10^{-8} \cdot \mathbf{FD}^2 + 0.001 \cdot \mathbf{FD} + 1.04$$

Donde **FD** es el factor de dilución calculado matemáticamente y  $F_D$  es el factor de ajuste por el efecto de no linealidad en el sistema. Este factor se aplica en la forma  $F_D^{-1}$  al factor de dilución matemático. El factor  $F_D$  fue validado en el ensayo de evaluación del sesgo y de efecto de matriz, resultando adecuado para su propósito.

## 5.1.5. Procedimiento desarrollado



Se desarrolló un método para la determinación de aluminio en contenido gástrico por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica, para la confirmación de intoxicaciones por fosfuro de aluminio. El procedimiento desarrollado se esquematiza de la siguiente manera:

Ilustración 31. Diagrama del procedimiento de preparación de las muestras de contenido gástrico para la determinación de aluminio por Absorción Atómica





## 5.1.6. Límite de decisión

El límite de decisión se determinó por medio del grupo de muestras negativas verdaderas (VN). Previamente se verificó del supuesto de normalidad de este grupo



Se observa en el histograma que una de las mediciones es posiblemente atípica. Este valor podría tener la suficiente fuerza de influencia sobre el resto de la muestra de datos como para generar un sesgo inaceptable. Esto fue verificado por evaluación visual de gráficos de probabilidad normal y el test de Anderson-Darling para una distribución normal. También se aplicó el test de Grubbs para examinar el dato identificado como dudoso



Tabla 30. Pruebas de normalidad para grupo VN

Se comprobó que uno de los datos evaluado es atípico con respecto al resto de valores y que además tiene el suficiente peso como para sesgar la distribución normal de la muestra de mediciones.



Una vez eliminado del grupo "VN" se graficó un nuevo histograma y se realizó un nuevo test de normalidad





Una vez que se ha eliminado el valor atípico, se realizó nuevamente el test de Grubbs y no se detectó ningún otro valor anómalo. Aunque se observa una ligera desviación en la distribución esto es tolerable en muestras relativamente pequeñas.

Una vez verificada la normalidad de los datos, se realizó una de simulación de datos por el método de Monte Carlo utilizando como modelo de cálculo la función analítica especificada. Las concentraciones calculadas de las muestras reales se muestran en la **Tabla 31** 

muestra	Absorbancia	Concentración (mg/L)	muestra	Absorbancia	Concentración (mg/L)
Blanco	0.0573				
1	0.0562	78.1	9	0.0536	70.3
2	0.0576	82.2	10	0.0486	55.4
3	0.0515	64.1	11	0.0497	58.7
4	0.0473	51.6	12	0.0477	52.8
5	0.0474	51.9	13	0.0501	59.9
6	0.0467	49.8	14	0.0495	58.1
7	0.0498	59.0	15	0.0550	74.5
8	0.0422	36.4	16	0.0526	67.3

Tabla 31. Concentraciones calculadas en muestras VN



MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA AL ANÁLISIS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO

#### **Carlos Iván Roque**

## Tabla 32. Simulación de datos en concentraciones de muestras negativas verdaderas (VN)

Software: Quantum XL Banyan Tree Engine (Rocket mode) Generación de números aleatorios: Mersenne Twister 10000 Simulaciones en 0,10 segundos

Variables de entrada			Percentiles (mg/L
b2	Media	Desvío estándar	Máximo
Distribución: Normal	-0.00017867	2.90853E-07	99.9999%
b1	Media	Desvío estándar	99.999%
Distribución: Normal	0.021278	1.13768E-05	99.99%
b0	Media	Desvío estándar	99.95%
Distribución: Normal	0.08722	8.09701E-05	99.90%
A <sub>bik</sub>	Media	Desvío estándar	99.50%
Distribución: Normal	0.07629	0.0151	99%
Α	Media	Desvío estándar	95%
Distribución: Normal	0.0503	0.0040	90%

Resultados	C (mg/L)
Número de Simulaciones	10,000
Media	117.46
Desvío estándar	46.67
Varianza	2178.47
Mediana	117.45
Límite de detección (LD)	101.01
Valores simulados menores a LD	3623
Test de normalidad	
Valor p Test Smirnov-Kolgomorov	>0.15



305.32

305.29

305.00

302.14

278.16

## Ilustración 35. Histograma de concentraciones simuladas



Se observa que alrededor del 40% de las muestras tienen concentraciones menores al límite de detección y alrededor del 99,99% están por debajo del límite de cuantificación.

## Tabla 33. Estimación de límite de decisión

Media (µ)	117.46	Z	-3.72
Desvío estándar (σ)	46.67	Límite superior (99,99%)	291.04

El 99,99% de las concentraciones calculadas podrían ser menores a 291,04 mg/L. esta cantidad es menor al límite de cuantificación, pero superior al límite de detección. Se estableció entonces como límite de decisión **300 mg/L** 

La probabilidad de que un verdadero negativo, de esta misma población simulada, sobrepase este valor es del 0.0046% (aproximadamente 5 por cada 100000 muestras)

## 5.2. Pruebas de validación

## 5.2.1. El modelo de calibración (linealidad)

## 5.2.1.1. Prueba para valores atípicos y normalidad

Se realizó el experimento conforme al procedimiento descrito. Se obtuvieron una serie de seis réplicas de mediciones en cinco niveles de concentración incluyendo un nivel cero. Simultáneamente se verificó la ausencia de datos atípicos. Los resultados se exponen en la **Tabla 34** 

Una vez verificados los resultados se verificó el supuesto de la normalidad de los datos. El análisis se realizó en MINITAB<sup>®</sup>, los gráficos se muestran en la **Ilustración 36**. Se verificó que las réplicas en cada nivel tienen una distribución aproximadamente normal.



			EVALUACIÓN DE DATOS ATÍPICOS										
Concentración		Réplicas de mediciones (A/s)											
(mg/	(mg/L)									)		HUBER (r)	Γ
(8/ =/		R1	R2	R3	R4	R5	R6	media	S	rsd	mediana/MAD	MED-3,5MAD	MED+3,5MAD
CAL 0	0	0.0524	0.0525	0.0623	0.0503	0.0392	0.0396	0.0494	0.0088	17.79	0.0514	0.0302	0.0725
	r	0.0011	0.0012	0.0110	0.0011	0.0122	0.0118				0.0061		
	G	0.3434	0.3548	1.4703	0.1043	1.1591	1.1136						
CAL 1	10	0.1947	0.2408	0.2121	0.2194	0.2262	0.2442	0.2229	0.0185	8.29	0.2228	0.1726	0.2730
	r	0.0281	0.0180	0.0107	0.0034	0.0034	0.0214				0.0144		
	G	1.5253	0.9682	0.5841	0.1893	0.1785	1.1521						
CAL 2	20	0.3892	0.3609	0.3600	0.3597	0.3783	0.3745	0.3704	0.0122	3.30	0.3677	0.3402	0.3952
	r	0.0215	0.0068	0.0077	0.0080	0.0106	0.0068				0.0079		
	G	1.5369	0.7807	0.8544	0.8790	0.6442	0.3330						
CAL 3	30	0.4646	0.4763	0.4976	0.4389	0.4465	0.4450	0.4615	0.0225	4.88	0.4556	0.4080	0.5032
	r	0.0091	0.0208	0.0421	0.0167	0.0091	0.0106				0.0136		
	G	0.1383	0.6574	1.6025	1.0020	0.6648	0.7313						
CAL 4	40	0.4781	0.5187	0.5224	0.4389	0.4465	0.5202	0.4875	0.0385	7.89	0.4984	0.4183	0.5786
	r	0.0203	0.0203	0.0240	0.0595	0.0519	0.0218				0.0229		
	G	0.2436	0.8123	0.9085	1.2631	1.0655	0.8513	G <sub>TAB,n=6</sub>	1.887				

Tabla 34. Resultados de medición espec	trofotométrica de soluciones acuosas de aluminio
----------------------------------------	--------------------------------------------------

## 5.2.1.2. Análisis del modelo

Se estimo el modelo de regresión cuadrática, su gráfica respectiva incluyendo la banda de confianza de regresión (CI) y el intervalo de confianza de la predicción en el rango de calibración, con un 95% de confianza (**Ilustración 37**)



## Homogeneidad de varianzas

Se verificó la homogeneidad de la varianza efectuando una prueba de Fisher con la varianza correspondiente a la concentración más alta contra la respectiva al nivel más bajo (confianza 99%). Los resultados se muestran en la

		Réplicas de mediciones (A/s)									
NIVEL	C (mg/L)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	media	S	rsd	S <sup>2</sup>
CAL 0	0	0.0524	0.0525	0.0623	0.0503	0.0392	0.0396	0.0494	0.0088	17.79	0.000077
CAL 1	10	0.1947	0.2408	0.2121	0.2194	0.2262	0.2442	0.2229	0.0185	8.29	0.000342
CAL 2	20	0.3892	0.3609	0.36	0.3597	0.3783	0.3745	0.3704	0.0122	3.30	0.000149
CAL 3	30	0.4646	0.4763	0.4976	0.4389	0.4465	0.445	0.4615	0.0225	4.88	0.000508
CAL 4	40	0.4781	0.5187	0.5224	0.4389	0.4465	0.5202	0.4875	0.0385	7.89	0.001478
										F <sub>EXP</sub>	4.33
										F <sub>TAB</sub> (α=0,01)	10.97

#### Tabla 35

Adicionalmente se examinaron los gráficos de los residuales del modelo de regresión





Se observa que los gráficos de residuales no exponen una tendencia sistemática en la variabilidad de las desviaciones. Cuan do los sistemas de regresión son heterocedásticos se espera generalmente observar una tendencia ascendente en la dispersión de los puntos residuales con respecto a la línea central.

La prueba estadística con las varianzas y el examen de los residuales demuestran que el modelo puede ser considerarse homocedástico dado que no se encontró evidencia suficiente para inferir lo contrario.

## Ajuste del modelo

Se estudió el modelo de regresión lineal simple (RLS) contra el modelo de regresión cuadrática (QUAD), evaluando el ajuste de ambos algoritmos con la prueba de linealidad de Mandel (confianza 99%)

Coeficientes de regresión							
	RLS	QUAD					
b <sub>o</sub>	0.0954	0.0452					
b <sub>1</sub>	0.0111	0.0212					
b <sub>2</sub>		-0.0003					
gl	3	2					
S <sub>Ai</sub> <sup>2</sup>	0.002996	0.000080					
N		5					
		Test de Mandel					
DS2	0.00883						
VP	110.61						
F <sub>tabla</sub>		98.50					

Tabla 36. Datos para el test de Mande	l (ajuste del modelo)
---------------------------------------	-----------------------

El modelo RLS no mostró proporcionar un mejor ajuste al sistema de calibración que la calibración cuadrática. Una comparación de los gráficos de residuales para ambos modelos provee también fundamentos para seleccionar un ajuste de regresión cuadrática

#### MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA AL ANÁLISIS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO



#### **Carlos Iván Roque**



Debido a que la tendencia curvilínea del gráfico de calibración persiste aún a concentraciones más bajas, se decidió desarrollar un modelo de regresión de segundo orden para lograr una mejor aproximación del sistema de calibración.Seleccionado el modelo cuadrático se verificó el ajuste del mismo por análisis de varianza, el cual fu resuelto en MINITAB®

#### Tabla 37. Reporte de análisis de varianza realizado con MINITAB® Modelo de Regresión

A =  $0.04516 + 0.02119 \text{ c} - 0.000251 \text{ c}^2$ Desvío estándar del modelo = 0.00893344

Coeficiente de determinación (%) = 99.9% Coeficiente de correlación = 99.8%

Análisis de varianza

Fuente	DF	SS	MS	F	Р
Regresión	2	0.133094	0.0665472	833.86	0.001
Error	2	0.000160	0.0000798		
Total	4	0.133254			

## 5.2.1.3. Valores de dispersión de la curva de calibración en condiciones de repetibilidad

Parámetro	Resultado	Criterio de evaluación
Desviación estándar residual	0.0089	No especificado
Sensitividad	0.0111	No especificado
Desvío estándar de la predicción de la concentración	0.8014	No especificado
RSD <sub>rCx</sub> [%]	4.01%	≤ 5%
Desvío estándar de $b_0$ (Sb <sub>0</sub> )	2.4995E-03	No especificado
Desvío estándar de b <sub>1</sub> (Sb <sub>1</sub> )	0.000351194	No especificado
Desvío estándar de b <sub>2</sub> (Sb <sub>2</sub> )	8.97844E-06	No especificado

Tabla 38	. Parámetros	de dispersión e	n condiciones	de repetibilidad
----------	--------------	-----------------	---------------	------------------

Adicionalmente se determinaron otras figuras de mérito que proporcionan información sobre la calidad de la curva de calibración

## Tabla 39. Otros parámetros de calidad de la curva de calibración

Concentración característica (mg/L)	1.88
Masa característica (ng)	0.31
%QC	2.54%
Q (factor de curvatura)	0.4505



## 5.2.1.4. Valores de dispersión en condiciones de precisión intermedia

Se determinaron características de variabilidad del sistema de calibración en condiciones de reproducibilidad dentro del mismo laboratorio, con el mismo analista, en distintos días. Las mediciones y los parámetros estimados se muestran en la **Tabla 40** y **Tabla 41** 

		Absorbancias (A/s)							
C (mg/L)	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	MEDIA		
0	0.0953	0.0878	0.0970	0.0821	0.0855	0.0671	0.086		
10	0.2782	0.3258	0.2835	0.2979	0.2681	0.2778	0.289		
20	0.4093	0.4935	0.4426	0.3925	0.4175	0.4281	0.431		
30	0.5023	0.6676	0.5629	0.4936	0.5884	0.6211	0.573		
40	0.5767	0.7834	0.6185	0.5492	0.6687	0.7054	0.650		

## Tabla 40. Curvas de calibración acuosa durante 6 días consecutivos

#### Tabla 41. Figuras de mérito de las curvas de calibración

	ENTRE DÍAS	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6
S <sub>A</sub>	0.0106	0.0074	0.0122	0.0084	0.0227	0.0191	0.0241
Sensitividad	0.0141	0.0119	0.0173	0.0132	0.0113	0.0149	0.0162
Srcx	0.7510	0.6268	0.7068	0.6375	2.0127	1.2824	1.4858
RSDr <b>[%]</b>	3.75	3.13	3.53	3.19	10.06	6.41	7.43
Conc. Característica (mg/L)	3.77	4.70	3.50	3.93	4.14	3.78	2.72
Masa característica (ng)	0.62	0.77	0.57	0.64	0.68	0.62	0.45
%QC	1.99	2.18	2.76	2.31	7.78	3.24	3.49
Q	0.2529	0.3070	0.1962	0.3247	0.3969	0.1759	0.1853

#### Tabla 42. Componentes de variabilidad de la curva de calibración

	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	suma	S <sub>A(R)</sub> <sup>2</sup>	
S <sub>Aj</sub> <sup>2</sup>	0.00006	0.00015	0.00007	0.00052	0.00036	0.00058	0.00174	0.00029	
			Predi	cciones					
c (mg/L)	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	A <sub>pred-media</sub>	S <sub>Apred</sub> <sup>2</sup>	Cx (C <sub>pred</sub> )
0	0.0985	0.0910	0.0935	0.0922	0.0821	0.0659	0.0872	0.000137	-0.07
10	0.2719	0.3153	0.2901	0.2725	0.2700	0.2729	0.2821	0.000319	10.36
20	0.4088	0.5056	0.4438	0.4079	0.4318	0.4499	0.4413	0.001296	19.25
30	0.5093	0.6619	0.5546	0.4985	0.5674	0.5969	0.5648	0.003611	30.76
40	0.5733	0.7842	0.6224	0.5442	0.6768	0.7139	0.6525	0.008123	39.69
				S	2				
				- 1	Aj(Cx)				
c (mg/L)	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	S <sub>Aj(cx)</sub> media	S <sub>m</sub> <sup>2</sup>	S <sub>Apred(cx)</sub> <sup>2</sup>
0	5.45E-06	1.36E-05	6.64E-06	4.77E-05	2.98E-05	3.81E-05	2.35E-05	0.00011	0.00002
10	1.50E-05	4.73E-05	2.06E-05	0.000141	9.81E-05	0.000158	8.00E-05	0.00024	0.00005
20	2.26E-05	7.58E-05	3.15E-05	0.000211	0.000157	0.000261	0.000126	0.00117	0.00022
30	2.81E-05	9.92E-05	3.94E-05	0.000258	0.000206	0.000346	0.000163	0.00345	0.00060
40	3.17E-05	0.000118	4.42E-05	0.000282	0.000246	0.000414	0.000189	0.00793	0.00135

## Tabla 43. Figuras de mérito de la variabilidad del sistema de calibración entre días

c (mg/L)	S <sub>total</sub> <sup>2</sup>	S <sub>r(CAL)</sub>	RSDr <sub>(CAL)</sub> [%]	S <sub>R(CAL)</sub> <sup>2</sup>	RSD <sub>R(CAL)</sub> [%]	IC <sub>Apred</sub>	LIA	LSA		
0	0.00043	0.80	NA*	0.94	NA*	0.0531	0.0342	0.1403		
10	0.00058	0.97	9.34	1.31	12.62	0.0620	0.2202	0.3441		
20	0.00167	1.18	6.14	2.65	13.78	0.1052	0.3361	0.5465		
30	0.00434	1.65	5.38	5.94	<u>19.32</u>	0.1693	0.3954	0.7341		
40	0.00958	2.40	6.04	12.78	<u>32.20</u>	0.2516	0.4009	0.9040		
	*No aplica, los valores obtenidos no son realísticos									



Desvío estándar de b <sub>0</sub> (Sb <sub>0</sub> )	6.5562E-09
Desvío estándar de b <sub>1</sub> (Sb <sub>1</sub> )	1.13768E-05
Desvío estándar de b <sub>2</sub> (Sb <sub>2</sub> )	2.90853E-07

Ilustración 41. Bandas de intervalo de predicción (verde) y de confianza en condiciones de precisión entre días



El sistema de calibración entre días muestra un comportamiento marcadamente heterocedástico, indicando que la imprecisión es mayor en las concentraciones más altas cuando se hacen mediciones entre varios días. Existe un error sistemático proporcional a la concentración del analito, que tiene un comportamiento cuadrático. Esto puede ser deducido también por las ecuaciones que describen los componentes de variabilidad y del intervalo mismo de predicción (**Ecuación 77**)

Este modelo no es adecuado para las mediciones rutinarias; sin embargo es útil para evaluar la variabilidad de la linealidad del sistema en el transcurso del tiempo. También permitirá estimar parámetros de límite como el límite de detección y de cuantificación; así también se aplica para la determinación de un límite de *cut off* en las mayores condiciones de variabilidad posible durante el desarrollo del método analítico.

No obstante, se demostró que el sistema de calibración tiene una precisión adecuada a su propósito en condiciones de repetibilidad en el rango de concentraciones evaluadas; en condiciones de reproducibilidad intra-laboratorio (variando el día de trabajo) se demostró que el sistema tiene una precisión adecuada hasta un nivel de concentración menor a 30 mg/L

## 5.2.2. Validación del modelo de ajuste por efecto de matriz (FR)

Se realizó la medición de las alícuotas fortificadas aplicando el factor desarrollado. Se consideró como aceptable porcentajes de recuperación entre 75% y 120%. Se aplicó también el factor de ajuste por efecto de dilución. La determinación de este factor se expone más adelante.



CÁLCULO DE CONCENTRACIONES POR IEA									
Coeficientes de regresión b <sub>2</sub> b <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	-0,00005 0,0091 0,1826	$\mathbf{C}_{exp} = \left[\frac{\left(-\mathbf{b1} + \sqrt{\mathbf{b_1}^2 - \mathbf{b_2}(\mathbf{b_0} - \mathbf{A_x} - \mathbf{A_{blk}})}\right)}{2 \cdot \mathbf{b_2}}\right] \cdot \frac{\mathbf{V_{d1}}}{\mathbf{V_{a1}}} \cdot \mathbf{F_D}^{-1}$							
%QC	2.51	Función de a	nálisis	1		1			
	M1F	M2F	M3F	M4F	M5F	M6F			
Absorbancia	0,2569	0,2486	0,2478	0,2513	0,1900	0,1679			
C (mg/L) interpolación	27,17	25,92	25,80	26,32	17,66	14,75			
F <sub>D</sub>	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08			
FR	0,97	1,00	1,00	0,99	1,15	1,19			
C (mg/L) corregido con FR	1216,56	1191,05	1188,42	1199,71	933,95	811,26			
C (mg/mL) corregido con $F_D$	1,217	1,191	1,188	1,200	0,934	0,811			
Volumen de muestra (mL)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8			
Volumen de patrón (mL)	0,400	0,400	0,200	0,200	0,100	0,100			
Masa experimental de patrón (mg)	0.4866	0.4764	0.2377	0.2399	0.0934	0.0811			
Masa nominal de patrón agregado (mg)	0.4004	0.4004	0.2002	0.2002	0.1001	0.1001			
%R	121,4	118,9	118,6	119,7	93,2	81,0			

#### Tabla 44. Resultados de prueba de validación de la función de ajuste F<sub>R</sub>

El sistema de ajuste resultó adecuado para su propósito con un porcentaje de recuperación promedio de 108,8%

## 5.2.3. La exactitud (sesgo, repetitividad y precisión intermedia)

Se evaluó la capacidad del método para generar mediciones con un sesgo aceptable, repetitivas y reproducibles en condiciones internas del laboratorio.

## 5.2.3.1. Cálculo de concentraciones y evaluación del sesgo

Los resultados de las mediciones realizadas durante cinco días consecutivos, conforme al procedimiento planteado se exponen en la **Tabla 45**.

Tabla 45. Absorbancias de aluminio en contenido	gástrico obtenidas durante cinco días consecutivos
Tabla 43: Absorbancias de diamino en contenido	Sustines obternuus aarante entes alas consecutivos

Mo	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	S <sub>0</sub>	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
M1R1	0.1881	0.1274	0.1141	0.1228	0.1193	S1R1	0.2364	0.2582	0.2421	0.1431	0.2262
M1R2	0.1665	0.1159	0.1383	0.0982	0.1065	S1R2	0.2232	0.2255	0.2274	0.1457	0.1978
M1R3	0.1597	0.1178	0.1456	0.1090	0.1029	S1R3	0.2403	0.2134	0.2384	0.1543	0.1990
M1R4	0.1500	0.1038	0.1150	0.1005	0.1008	S1R4	0.2135	0.2104	0.2289	0.1479	0.1786
M1R5	0.1443	0.1064	0.1172	0.0848	0.0997	S1R5	0.2198	0.2181	0.2263	0.1431	0.1777
MEDIA	0.1617	0.1143	0.1260	0.1031	0.1058	MEDIA	0.2266	0.2251	0.2326	0.1468	0.1959
S	0.0171	0.0095	0.0148	0.0140	0.0080	S	0.0113	0.0194	0.0071	0.0046	0.0198
%RSD	10.55	8.29	11.74	13.62	7.52	%RSD	5.00	8.60	3.07	3.16	10.09
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
M2R1	0.1454	0.1256	0.1063	0.1115	0.1152	S2R1	0.2533	0.2033	0.3104	0.2109	0.1861
M2R2	0.1519	0.1255	0.1311	0.0862	0.1014	S2R2	0.2246	0.1864	0.2794	0.1887	0.1810



Mo	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	So	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
M2R3	0.1292	0.1152	0.1446	0.1005	0.1070	S2R3	0.2232	0.1968	0.2759	0.1913	0.2103
M2R4	0.1477	0.1074	0.1286	0.1027	0.1020	S2R4	0.2300	0.1608	0.2746	0.1961	0.2079
M2R5	0.1802	0.1092	0.1259	0.1128	0.0958	S2R5	0.2256	0.1823	0.2783	0.1914	0.1946
MEDIA	0.1509	0.1166	0.1273	0.1027	0.1043	MEDIA	0.2313	0.1859	0.2837	0.1957	0.1960
S	0.0185	0.0087	0.0138	0.0107	0.0073	S	0.0125	0.0163	0.0150	0.0089	0.0130
%RSD	12.27	7.45	10.82	10.40	6.98	%RSD	5.42	8.78	5.30	4.56	6.61
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
M3R1	0.1781	0.1317	0.1163	0.1266	0.1108	S3R1	0.2793	0.2323	0.1614	0.3316	0.2770
M3R2	0.1595	0.1085	0.1428	0.1250	0.1004	S3R2	0.2490	0.2353	0.1833	0.3101	0.2762
M3R3	0.1423	0.1123	0.1256	0.1140	0.0923	S3R3	0.2530	0.2431	0.1689	0.2988	0.2636
M3R4	0.1305	0.1178	0.1298	0.1089	0.0911	S3R4	0.2391	0.2345	0.1635	0.3024	0.2705
M3R5	0.1455	0.1171	0.1220	0.1101	0.0827	S3R5	0.2597	0.2890	0.1727	0.3129	0.2644
MEDIA	0.1512	0.1175	0.1273	0.1169	0.0955	MEDIA	0.2560	0.2468	0.1700	0.3112	0.2703
S	0.0183	0.0088	0.0100	0.0083	0.0106	S	0.0150	0.0239	0.0087	0.0128	0.0063
%RSD	12.07	7.49	7.84	7.13	11.13	%RSD	5.86	9.69	5.11	4.10	2.34

Las concentraciones calculadas para las alícuotas de S<sub>0</sub> se cotejaron con el valor nominal del material de referencia certificado, se calcularon la veracidad y el sesgo en términos porcentuales. También fueron promediadas las concentraciones calculadas de los cinco días para establecer un parámetro global de veracidad y sesgo. Estos resultados se exponen en la siguiente tabla: también se representa la variabilidad del resultado en función de los días.

	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	MEDIA	Ll <sub>95%</sub> *	LS <sub>95%</sub> *		
Absorbancia promedio	0.2380	0.2193	0.2288	0.2179	0.2207					
Concentración experimental (mg/mL)	1039	835	1024	1018	1020	987	912	1062		
Concentración nominal (mg/L)	1002	1002	1002	1002	1002					
Veracidad [%]	103.7	83.4	102.2	101.6	101.8	98.53	91.1	106.0		
Sesgo [%]	3.69	16.64	2.22	1.62	1.76	-1.47				

## Tabla 46. Resultados de veracidad y sesgo por día de solución control (S<sub>0</sub>)

\*LI95%: límite inferior de confianza (95%); LS95%: límite superior de confianza (95%)

#### llustración 42. Variabilidad de la concentración promedio de aluminio en la muestra control S₀ durante 5 días



Al evaluar los datos obtenidos se observa que la concentración media del día 2 difiere del resto de las estimaciones. El efecto de esto se comprueba al hacer la comparación de medias por análisis de varianza (ver más adelante). Este valor altera también el cálculo del sesgo, destacándose que la tendencia es hacia un sesgo positivo y sin embargo el sesgo promedio

resulta negativo. Se considera que la concentración estimada el día 2 responde a factores atípicos y se decide omitir este resultado para la estimación del sesgo del método

	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	MEDIA	Ll <sub>95%</sub> *	LS <sub>95%</sub> *	
Absorbancia promedio	0.2380	0.2288	0.2179	0.2207				
Concentración experimental (mg/mL)	1039	1024	1018	1020	1021	1012	1029	
Concentración nominal (mg/L)	1002	1002	1002	1002				
Veracidad [%]	103.7	102.2	101.6	101.8	102.32	101.5	103.2	
Sesgo [%]	3.69	2.22	1.62	1.76	2.32	1.5	3.2	
*LI95%: límite inferior de confianza (95%); LS95%: límite superior de confianza (95%)								

Tabla 47- Resultados de veracidad y	y sesgo de solución contro	l (S <sub>o</sub> ) omitiendo el día 2
Tabla 47- Resultados de Veracidad	sesso de solucion contro	$(\mathbf{J}_0)$ Unintiendo el día Z

Se demuestra que el método es capaz de proveer resultados suficientemente veraces, con un sesgo menor al 20% del valor nominal, considerando que la concentración de la solución control ensayado se encuentra en el límite inferior del rango operativo de trabajo. Se demuestra a la vez que el factor de ajuste por efecto de dilución es adecuado para el proceso. Esta prueba evaluó la inexactitud sistemática del método en sí mismo, sin tomar en cuenta el efecto de matriz. No fue posible determinar el sesgo en el espécimen biológico dado que no se cuenta con un material de referencia externo certificado para aluminio específicamente en contenido gástrico como matriz. Para evaluar la exactitud del método para las mediciones en matrices biológicas se efectuó una estimación de la recuperación.

## 5.2.3.2. Repetibilidad y precisión intermedia

Se calculó la imprecisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad entre días, expresados como desvíos estándar relativos, en escalas porcentuales, partiendo del análisis de varianzas ANOVA de los conjuntos de mediciones de  $M_0$  y  $S_0$ . La prueba de ANOVA se desarrolló para tres factores utilizando MATLAB<sup>®</sup>. Se obtuvieron las sumas de cuadrados medios de las réplicas (varianza residual), las preparaciones y los días.

Tabla 48. Resultados en alícuotas de <u>mezcla control</u> de contenido gástrico

			-								
Mo	Absorbancias (A/s) y variabilidad										
M1	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5						
MEDIA	0.1571	0.1143	0.1260	0.1031	0.11						
S	0.0171	0.0095	0.0148	0.0140	0.0080						
%RSD	10.55	8.29	11.74	13.62	7.52						
M <sub>2</sub>	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5						
MEDIA	0.1509	0.1166	0.1273	0.1027	0.10						
S	0.0185	0.0087	0.0138	0.0107	0.0073						
%RSD	12.27	7.45	10.82	10.40	6.98						
M₃	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5						
MEDIA	0.1512	0.1175	0.1273	0.1169	0.0955						
S	0.0183	0.0088	0.0100	0.0083	0.0106						
%RSD	12.07	7.49	7.84	7.13	11.13						

Tabla 49. Resultados en alícuotas de <u>solución control</u> de patrón acuoso

S <sub>0</sub>	Absorbancias (A/s) y variabilidad										
S <sub>1</sub>	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5						
MEDIA	0.2266	0.2251	0.2326	0.1468	0.20						
S	0.0113	0.0194	0.0071	0.0046	0.0198						
%RSD	5.00	8.60	3.07	3.16	10.09						
S <sub>2</sub>	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5						
MEDIA	0.2313	0.1859	0.2837	0.1957	0.20						
S	0.0125	0.0163	0.0150	0.0089	0.0130						
%RSD	5.42	8.78	5.30	4.56	6.61						
S3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5						
MEDIA	0.2560	0.2468	0.1700	0.3112	0.2703						
S	0.0150	0.0239	0.0087	0.0128	0.0063						
%RSD	5.86	9.69	5.11	4.10	2.34						

			VARIANZAS	-			Días	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	MAX	MIN	r <sub>cexp</sub>
M1	0.00029	0.00009	0.00022	0.00020	0.00006	0.00029	0.00006	4.6
M2	0.00034	0.00008	0.00019	0.00011	0.00005	0.00034	0.00005	6.5
M3	0.00033	0.00008	0.00010	0.00007	0.00011	0.00033	0.00007	4.8
MIN	0.00029	0.00008	0.00010	0.00007	0.00005		gl	4
MAX	0.00034	0.00009	0.00022	0.00020	0.00011	gl	r <sub>c/tabla</sub>	25.2
r <sub>c/exp</sub>	1.2	1.2	2.2	2.8	2.1	4	15.5	
r <sub>c/exp</sub> S1	<b>1.2</b> 0.00013	<b>1.2</b> 0.00037	<b>2.2</b> 0.00005	<b>2.8</b> 0.00002	<b>2.1</b> 0.00039	<b>4</b> 0.00039	<b>15.5</b> 0.00002	18.2
r <sub>c/exp</sub> S1 S2	<b>1.2</b> 0.00013 0.00016	<b>1.2</b> 0.00037 0.00027	<b>2.2</b> 0.00005 0.00023	<b>2.8</b> 0.00002 0.00008	<b>2.1</b> 0.00039 0.00017	<b>4</b> 0.00039 0.00027	<b>15.5</b> 0.00002 0.00008	18.2 3.3
r <sub>c/exp</sub> S1 S2 S3	<b>1.2</b> 0.00013 0.00016 0.00023	<b>1.2</b> 0.00037 0.00027 0.00057	<b>2.2</b> 0.00005 0.00023 0.00008	<b>2.8</b> 0.00002 0.00008 0.00016	<b>2.1</b> 0.00039 0.00017 0.00004	<b>4</b> 0.00039 0.00027 0.00057	<b>15.5</b> 0.00002 0.00008 0.00004	18.2 3.3 14.4
r <sub>c/exp</sub> S1 S2 S3 MIN	1.2   0.00013   0.00016   0.00023   0.00013	1.2   0.00037   0.00027   0.00057   0.00027	<b>2.2</b> 0.00005 0.00023 0.00008 0.00005	<b>2.8</b> 0.00002 0.00008 0.00016 0.00002	<b>2.1</b> 0.00039 0.00017 0.00004 0.00004	<b>4</b> 0.00039 0.00027 0.00057	15.5 0.00002 0.00008 0.00004 gl	18.2 3.3 14.4 4
r <sub>c/exp</sub> S1 S2 S3 MIN MAX	1.2   0.00013   0.00016   0.00023   0.00013   0.00013   0.00023	1.2   0.00037   0.00027   0.00057   0.00027   0.00057   0.00057	2.2   0.00005   0.00023   0.00008   0.00005   0.00005   0.00005	2.8   0.00002   0.00008   0.00016   0.00002   0.00016	2.1   0.00039   0.00017   0.00004   0.00004   0.00039	4 0.00039 0.00027 0.00057 gl	15.5 0.00002 0.00008 0.00004 gl r <sub>c/tabla</sub>	18.2 3.3 14.4 4 25.2

#### Tabla 50. Test de Hartley para varianzas por día (vertical) y preparación (horizontal)

Se verifica por el test de Hartley, con un 95% de confianza, que las varianzas de las réplicas son suficientemente homogéneas para ser utilizadas en el test de ANOVA

Se evaluó la variabilidad de las absorbancias medias agrupadas por réplicas, preparaciones y días de medición. Partiendo de la prueba de ANOVA, con las varianzas dentro de los grupos (réplicas) y entre los grupos (días), se determinó la repetibilidad y la precisión intermedia de laboratorio por la **Ecuación 89** y la **Ecuación 91**.

## Mezcla con matriz biológica (M<sub>0</sub>)

Tabla 51. Análisis de varianza para las mediciones en alícuotas de mezclas control de contenido gástrico									
Factor de variabilidad	SS	gl	CM	F	Prob>F				
RÉPLICA	0.0014632	4	0.00036579	2.87	0.0299				
PREPARACIÓN	2.25E-05	2	0.000011271	0.09	0.9155				
DÍA	0.024488	4	0.0061219	48.03	0.00E+00				
Error	0.0081576	64	0.00012746						
Total	0.034131	74							

Se observa que al menos una réplica no es igual en al menos una de las alícuotas o alguno de los días. Se corrió nuevamente el test, calculando interacciones entre factores

					5
Factor de variabilidad	SS	gl	СМ	F	Prob>F
RÉPLICA	0.0015	4	0.00037	4.65	0.0045
PREPARACIÓN	0.0000	2	0.00001	0.14	0.8671
DÍA	0.0245	4	0.00612	77.81	5.55E-16
Réplica*Preparación	0.0014	8	0.00017	2.15	0.0591
Réplica*día	0.0032	16	0.00020	2.53	0.0125
Preparación*Día	0.0011	8	0.00014	1.75	0.1245
Error	0.0025177	32	7.87E-05		
Total	0.034131	74			



Se verifica que las réplicas no se diferencian entre alícuotas ( $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ ); asimismo las alícuotas no se diferencian entre los días. Las réplicas varían entre días. Puede inferirse que esta variabilidad estadísticamente significativa podría deberse a factores que influyen en las tres preparaciones simultáneamente, por ejemplo factores de estabilidad de la muestra y el desgaste. Estos factores se evalúan en el ensayo de estabilidad.

## Solución control en medio acuoso (S<sub>0</sub>)

Tabla 53. Analisis de varianza para las mediciones en alicuotas de solución acuosa control						
Factor de variabilidad	SS	gl	CM	F	Prob>F	
RÉPLICA	0.0031	4	0.00078	0.43	0.7846	
PREPARACIÓN	0.0274	2	0.01368	7.59	0.0011	
DÍA	0.0043	4	0.00107	0.59	0.6699	
Error	0.11543	64	0.00180			
Total	0.15019	74				

Se observa por la variabilidad en las preparaciones  $(S_1, S_2, S_3)$  que al menos una no es igual al resto. No se evidencia una diferencia significativa entre las mediciones hechas entre días y entre réplicas. Se aplicó también el test, calculando interacciones entre factores para investigar si la variabilidad está relacionada a alguno de los otros factores.

Tabla 54. Análisis de varianza con interaccion	es en alícuotas de de solución acuosa control
------------------------------------------------	-----------------------------------------------

Análisis de varianza					
Factor de variabilidad	SS	gl	СМ	F	Prob>F
RÉPLICA	0.0031	4	0.00078	4.39	0.0061
PREPARACIÓN	2.74E-02	2	0.01368	77.01	5.89E-13
DÍA	0.0043	4	0.00107	6.01	1.01E-03
Réplica*Preparación	0.0015	8	0.00019	1.07	0.4078
Réplica*día	0.0014	16	0.00009	0.50	0.9280
Preparación*Día	0.1068	8	0.01335	75.14	0.00E+00
Error	0.0057	32	0.00018		
Total	0.1502	74			

Se verifica que al menos una alícuota preparada en al menos un día difiere significativamente de las demás. Esto es de hecho evidente en la evaluación de la veracidad donde se observa que una concentración es marcadamente sesgada con respecto al resto de los días. La **Tabla 54** muestra también que al menos en al menos un día, las señales de respuesta de al menos una preparación difieren en sus réplicas de las demás soluciones. Con las varianzas obtenidas se calculan la repetibilidad y la precisión intermedia (entre días y preparaciones)

	Mo	So
Días (p)	5	5
Réplicas (n)	5	5
<b>S</b> <sup>2</sup> (Varianza en repetibilidad)	0.00037	0.00078
media	0.1211	0.22493
RSDr[%]	15.79	12.42
${S_{D}}^{2}$ (Varianza en repetibilidad)	0.00115	0.00006
RSD <sub>D</sub> [%]	32.16	12.87
Intervalo de tolerancia		

## Tabla 55. CÁLCULOS DE PRECISIÓN E INTERVALO DE TOLERANCIA



	Mo	S <sub>0</sub>
R	87930.12	16491.9
B <sup>2</sup>	0.2000	0.2000
% sesgo	NA	2.32
Grados de libertad	4.0001	4.0004
tgl;0,975	0.7639	0.7639
Intervalo de tolerancia	26.92	10.77
Límite inferior	NA	-8.44
Límite superior	NA	13.09

En base a los resultados obtenidos se considera que el método provee una precisión aceptable en condiciones de repetibilidad, tomando en cuenta que la soluciones y mezclas control elaboradas se encuentran en cerca del límite inferior del rango efectivo de calibración. En condiciones de trabajo entre días y entre preparaciones independientes de una misma muestra, el método es capaz de proveer resultados reproducibles para soluciones acuosas, esto es favorable para la preparación de controles internos de la calidad para la verificación de la curva de calibración, demostrándose que una solución puede ser medida de forma precisa por al menos cinco días. En muestras biológicas se demostró que el método es apropiado para mediciones reproducibles entre alícuotas de una misma muestra preparadas en forma independiente, demostrándose que esto es factible al menos durante cinco días; sin embargo la precisión de la medición es afectada por el tiempo, ello posiblemente por factores de estabilidad de la muestra biológica, lo que es inherente a este tipo de matrices. Es recomendable realizar la medición el mismo día que se procesa la muestra. La estabilidad también fue evaluada y sus resultados se exponen más adelante.

## 5.2.4. Estabilidad

MEDIA

Pendiente (m)

Intercepto (b)

Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz durante cinco días consecutivos, repitiendo los ciclos de congelamiento y descongelamiento, para evaluar el tiempo viable para obtener datos reproducibles. Se construyeron gráficos de con las absorbancias promedio, registradas en cada una de las alícuotas durante cinco días. Se estudió la tendencia de la magnitud de la señal en función del tiempo. Se utilizaron las absorbancias del calibrador más bajo (10 mg/L) como referente de la tendencia del sistema instrumental, en especial por el proceso de desgaste que sufre el horno de grafito por el uso. Los calibradores son soluciones preparadas a diario, inmediatamente antes de efectuar las mediciones. Esta primera gráfica se muestra en la Ilustración 43

lā	Tabla 56. Absorbancias promedio de muestras de control (5 replicas cada dia) y coeficientes de regresioi							
	DÍA	<b>S1</b>	S2	S3	MH1	MH2	MH3	
	1	0.22664	0.23134	0.25602	0.16172	0.15088	0.15118	
	2	0.22512	0.18592	0.24684	0.11426	0.11658	0.11748	
	3	0.23262	0.28372	0.16996	0.12604	0.1273	0.1273	
	4	0.14682	0.19568	0.31116	0.10306	0.10274	0.11692	
	5	0.19586	0.19598	0.27034	0.10584	0.10428	0.09546	

0.2509

0.0093

0.2230

0.1222

-0.0123

0.1591

0.1204

-0.0107

0.1525

0.2185

-0.0061

0.2368

0.2054

-0.0140

0.2474

0.1217

-0.0112

0.1553



#### Ilustración 43. Tendencia de la intensidad de la señal en función del tiempo



Con estas mediciones se construyeron modelos de regresión.



Se calcularon los coeficientes de regresión, sus desvíos estándares e intervalos de confianza y se verificaron los supuestos enunciados en el procedimiento

Alícuota	Alícuota Pendiente (m) S t (m) Probabilidad 1195%* IS95%*						
Ancuota	r charcite (iii)	Um	exp (III)	TTODADIIIdad	EI 3370	23 33/0	
<b>S</b> <sub>1</sub>	-0.0140	0.0102	-1.37	0.2655	-0.0466	0.0186	
S <sub>2</sub>	-0.0061	0.0143	-0.43	0.6987	-0.0516	0.0394	
S₃	0.0093	0.0180	0.52	0.6415	-0.0480	0.0666	
M1	-0.0123	0.0050	-2.44	0.0925	-0.0283	0.0037	
M <sub>2</sub>	-0.0107	0.0037	-2.87	0.0640	-0.0226	0.0012	
M <sub>3</sub>	-0.0112	0.0035	-3.17	0.0506	-0.0225	0.0001	
*LI95%: límite ir	nferior de confianza (95%)	; LS95%: límit	e superior de	confianza (95%)			

.... nadalaa da vaavasić.

Tabla 58. Prueba para verificar la correlación de la señal y los días de ensayo	
---------------------------------------------------------------------------------	--

	S1	S2	S3	MH1	MH2	MH3
Coeficiente de Correlación (r <sup>2</sup> )	0.3833	0.0571	0.0815	0.6650	0.7331	0.7698
t <sub>exp</sub>	1.365	0.426	0.516	2.440	2.870	3.167
t <sub>tabla</sub>	3.182	3.182	3.182	3.182	3.182	3.182
р	0.2655	0.6987	0.6415	0.0925	0.0640	0.0506



Para evaluar la incidencia del desgaste del horno de grafito en la tendencia descendente de las absorbancias de los controles se construyó una gráfica con el promedio de las mediciones de totales de  $M_0$  y  $S_0$  respectivamente, cotejadas con el calibrador de referencia; seguidamente se verificaron los supuestos enunciados en el procedimiento.



Ilustración 45. Comparación de tendencias entre calibrador (10 mg/L) y controles S0 y M0

ρίλ	Absorbancias promedio						
DIA	Calibrador de referencia (10 mg/L)	S <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>				
1	0.2782	0.2380	0.1546				
2	0.3258	0.2193	0.1161				
3	0.2835	0.2288	0.1269				
4	0.2979	0.2179	0.1076				
5	0.2681	0.2207	0.1019				
m	-0.0048	-0.0036	-0.0114				
b	0.3051	0.2357	0.1556				
S <sub>m</sub>	0.007684	0.002275	0.0038				
Estadístico t	-0.63	-1.58	-3.00				
Probabilidad	0.5757	0.2122	0.0577				
Inferior 95%	-0.02926	-0.01084	-0.02349				
Superior 95%	0.019644	0.003646	0.000694				
$H_0: m_{CR} - m_{M/S} = 0$							
t <sub>exp</sub>		0.53	-1.73				
t <sub>tabla</sub>		3.18	3.18				

#### Tabla 59. Pruebas para diferencia de pendientes

Se verifica que las pendientes de los modelos para cada alícuota (**Tabla 57**) no difieren significativamente de cero, con un 95% de confianza, con mayor certeza en las soluciones control que en las mezclas de matriz biológica. Aunque estadísticamente no se concluye que las muestras biológicas tengan una tendencia proporcional en el tiempo, la prueba misma demuestra que la probabilidad mínima para rechazar la hipótesis nula (m = 0) es estrechamente cercana al límite  $\alpha$  y existe un riesgo no despreciable de cometer un error tipo II. Por criterio conservador se prefiere inferir que existe un cierto riesgo de obtener mediciones cada vez más sesgadas a medida que pasan los días de almacenamiento de la muestra, incluso cuando estadísticamente las mediciones no varíen en una magnitud importante dentro de los cinco primeros días. Los mismos resultados se obtienen en la **Tabla** 



**58**, donde se muestra que hay ciertos indicios de una tendencia sistemática en las muestras con matriz biológica.

De los resultados expresados en la **Tabla 59** se deduce que hay un efecto de desgaste del horno de grafito por uso diario (durante la realización de estos ensayos se efectuaron no menos de cincuenta ciclos de atomización diaria). Este efecto puede explicar en parte el decrecimiento de la intensidad de la señal en los controles  $M_0$  y  $S_0$ . Sin embargo este factor no es el único que explica la variabilidad en las muestras, en especial de la matriz biológica.

Aunque se sigue detectando una cierta variabilidad que es necesario controlar en la medición de las muestras de contenido gástrico, es importante recalcar que el problema de la reproducibilidad, incluyendo la estabilidad, se ha resuelto considerablemente. El uso de una solución de ácido clorhídrico y ácido cítrico ha resultado eficaz para mantener mediciones más consistentes en un tiempo razonable, aunado también a la mejora en los procesos de almacenamiento y tratamiento preanalítico de las muestras. Aunque la variabilidad sigue teniendo una relevancia estadística, el método puede ser considerado adecuado para obtener mediciones fiables, siempre que no sea afectado el riesgo de resultados positivos o negativos falsos. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, se definió un límite de decisión robusto y seguidamente fue evaluada la selectividad del método, con ello se demostró finalmente que el método desarrollado es adecuado para su propósito.

## 5.2.5. Recuperación

La recuperación total definida como la transferencia completa del analito de la matriz a la solución final, se determinó partir de una relación de señales entre una muestra biológica fortificada y una misma cantidad de analito en solución acuosa.

Se prepararon seis réplicas de dos mezclas en matrices biológicas independientes, de soluciones acuosas de aluminio patrón y un blanco de solvente conforme al procedimiento expuesto (**Tabla 14, Ilustración 11**) y se registraron las absorbancias de las mismas. Las réplicas fueron examinadas con un test de Grubbs (**G**) para detectar valores *outliers*. No se detectaron absorbancias atípicas.

	Absorbancia	G <sub>exp</sub>		Absorbancia	G <sub>exp</sub>
M1OR1	0.0963	0.514	M2OR1	0.12	1.105
M1OR2	0.0744	0.795	M2OR2	0.1396	0.098
M1OR3	0.1181	1.816	M2OR3	0.1565	0.769
M1OR4	0.0785	0.550	M2OR4	0.1301	0.586
M1OR5	0.081	0.400	M2OR5	0.1724	1.586
M1OR6	0.0779	0.586	M2OR6	0.1305	0.566
MEDIA	0.0877		MEDIA	0.1415	
S	0.0167		S	0.0195	
%RSD	19.08		%RSD	13.76	
M1FR1	0.2997	1.143	M2FR1	0.2622	1.568
M1FR2	0.2429	1.095	M2FR2	0.2363	0.381

#### Tabla 60. Resultados de pruebas de recuperación en dos mezclas



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO

**Carlos Iván Roque** 

	Absorbancia	G <sub>exp</sub>		Absorbancia	G <sub>exp</sub>	
M1FR3	0.2973	1.048	M2FR3	0.2526	0.846	
M1FR4	0.241	1.170	M2FR4	0.2265	1.119	
M1FR5	0.2744	0.146	M2FR5	0.2362	0.389	
M1FR6	0.2689	0.071	M2FR6	0.2344	0.524	
MEDIA	0.2707		MEDIA	0.24		
S	0.0254		S	0.0133		
%RSD	9.38		%RSD	5.50		
S500R1	0.2584	1.547	S250R1	0.1966	1.005	
S500R2	0.253	0.614	S250R2	0.1885	0.169	
S500R3	0.2506	0.199	S250R3	0.1810	1.256	
S500R4	0.2471	0.406	S250R4	0.1821	1.096	
S500R5	0.2424	1.219	S250R5	0.1940	0.628	
S500R6	0.2452	0.735	S250R6	0.1958	0.889	
MEDIA	0.2495		MEDIA	0.19		
S	0.0058		S	0.0069		
%RSD	2.32		%RSD	3.64		
BLANCO DE SOLVENTE						
	Absorbancia	G <sub>exp</sub>	Simbología			
BLK R1	0.0742	1.655	М	Mezcla en matriz biológica		
BLK R2	0.0617	0.755	BLK	Blanco de solvente		
BLK R3	0.0731	1.443	R	Réplica		
BLK R4	0.0623	0.639	MiO (i=1,2)	Mezcla con matriz sin fortificar		
BLK R5	0.0605	0.987	M1F	Mezcla con matriz 1 fortificada con 500 mg/L de aluminio		
BLK R6	0.0619	0.717				
MEDIA	0.0656		ivizr iviezcia con matriz 2 fortificada con 250 mg/L de aluminio			
S	0.0052		S500	Solución patrón acuoso 500 mg/L		
%RSD	7.90		S250	Solución patrón acuoso 250 mg/L		

	M1	M2
Matriz sin fortificar (MiO)	0.0877	0.1415
Matriz fortificada (MiF)	0.2707	0.2414
S <sub>500</sub> (S1)	0.2495	
S <sub>250</sub> (S2)		0.1897
Blanco (blk)	0.0656	0.0656
RECUPERACIÓN (%)	99.55	80.49

Tabla 61. Resultados de ensayo de recuperación

Los resultados obtenidos demuestran que el método provee una recuperación adecuada. El porcentaje de recuperación de la mezcla de matriz 2 (M2) pudo ser afectado por el procedimiento de preparación, por el que la solución acuosa de contraste fue preparada de manera más disímil que el conjunto M1 y S1. Sin embargo, tomando como referencia el parámetro de evaluación se considera que la recuperación del método es aceptable.

# 5.2.6. Límites analíticos: Valor crítico (LC), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Se determinó el límite de detección partiendo de blancos de solvente y el modelo de calibración, para establecer la concentración calculada máxima que puede ser atribuida al


blanco de solvente. Se registraron las mediciones de 6 réplicas de blanco de solvente durante 5 días consecutivos.

	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	MEDIA
B1	0.0854	0.0808	0.0845	0.0804	0.0813	0.0825
B2	0.0868	0.1016	0.0703	0.0778	0.0823	0.0838
B3	0.0743	0.0964	0.0716	0.0747	0.0718	0.0778
B4	0.0675	0.0907	0.0681	0.0653	0.0823	0.0748
B5	0.0652	0.0842	0.0632	0.0602	0.0744	0.0694
B6	0.0830	0.0804	0.0625	0.0577	0.0641	0.0695
MEDIA	0.0770	0.0890	0.0700	0.0694	0.0760	0.0763
S	0.0094	0.0087	0.0080	0.0096	0.0073	0.0108

#### Tabla 62: Registro de absorbancias de seis réplicas durante cinco días

Se efectuó un análisis de varianza de las absorbancias, determinando seguidamente los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad entre días

Tabla 63. Análisis de varianza											
Suma de Grados de Promedio de los											
Origen de las variaciones	cuadrados	libertad	cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F					
RÉPLICAS	0.00096	5	0.00019	4.19	0.0091	2.71					
DÍAS	0.00150	4	0.00037	8.23	0.0004	2.87					
Error	0.00091	20	0.00005								
Total	0.00337	29									

#### Tabla 64: Cálculos de precisión del blanco de solvente

Estimadores	Valores
S <sub>r</sub> <sup>2</sup>	0.00019
media	0.0763
RSDr[%]	18.12
S <sub>D</sub> <sup>2</sup>	0.00004
RSD <sub>D</sub> [%]	19.78

#### Tabla 65. Cálculos para el límite de detección y cuantificación de las soluciones diluidas en 5 mL

Absorbancia media del blanco ( A <sub>blk</sub> )	0.0763
Desvío estándar del blanco (S <sub>blk(T)</sub> )	0.0151
Desvío estándar total de curva de calibración $[S_{total}^{2} (C_{x} = 0)]$	0.00043
t <sub>(n-1;1-α)</sub> (A <sub>blk</sub> )	3.4954
Intervalo de confianza de la señal del blanco (IC <sub>Ablk</sub> )	0.05276
Límite de señal crítico (A <sub>LC</sub> )	0.1291
Límite de concentración crítico (C <sub>LC</sub> [mg/L])	2.00
$t_{(n-1;1-\beta)}(\mathbf{L}_{\mathbf{D}})$	2.1318
S <sub>total</sub> <sup>2</sup> (C <sub>LC</sub> )	0.0004
Límite de detección C <sub>LD</sub> (mg/L)	2.12
Factor k (33,3%)	3
Límite de cuantificación C <sub>LQ</sub> (mg/L)	6.36
C <sub>LD</sub> (mg/L) en muestra	101.01
C <sub>LQ</sub> (mg/L) en muestra	304.37

Se determinó una concentración en la curva de calibración de **2,12 mg/L** como límite de detección y **6,36 mg/L** como límite de cuantificación, con valores obtenidos en las condiciones de mayor variabilidad posible durante el estudio (mediciones en distintos días, diferentes



réplicas e interpolada en una curva de calibración construida en condiciones de precisión entre días)

Suponiendo que una muestra biológica al ser interpolada resultara con una concentración comparable con el límite de detección o el límite de cuantificación, al aplicar la función de análisis se reportaría aproximadamente con niveles de **101,01 mg/L** ó **304,37 mg/L** respectivamente. De manera que concentraciones menores a 101,01 mg/L deberán asumirse como niveles por debajo del límite de detección y hasta 304,37 mg/L como detectables pero no cuantificables dentro de un factor de cobertura k = 3.

			Tabla 66	5. Cálculo de	e lím	ites aı	nalíticos d	el método			
-	1	/. \	00.46		1	(	07.74		1	(.)	ſ

C <sub>LC</sub> (mg/L) 92.16 C <sub>LD</sub> (mg/L) 97.74 C <sub>LQ</sub> (mg/L) 293.
---------------------------------------------------------------------------------------

Estos niveles se consideran adecuados en vista de que resultan inferiores a los registrados en muestras positivas estudiadas en los ensayos para la evaluación de la selectividad.

# 5.2.7. Selectividad

Las concentraciones calculadas de las muestras negativas (VN2) y positivas verdaderas (VP) y los datos simulados se muestran en la **Tabla 67** y **Tabla 68** respectivamente

				,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
	VERDADEROS NEGA		VERDADEROS F		
	Absorbancia	C (mg/L)		Absorbancia	
1	0.0765	138.6	1	0.2029	
2	0.0416	34.6	2	0.1897	
3	0.0606	91.2	3	0.2121	
4	0.0955	195.3	4	0.2301	
5	0.0609	92.0	5	0.2628	
6	0.048	53.7	6	0.2717	
			7	0.2336	

Tabla 67. Resultados de las muestras negativas (VN2) y positivas verdaderas (VP)

	VERDADEROS POSITIVOS (Gru	upo VP)
	Absorbancia	C (mg/L)
1	0.2029	516.0
2	0.1897	476.8
3	0.2121	543.3
4	0.2301	596.3
5	0.2628	691.6
6	0.2717	717.2
7	0.2336	606.6
8	0.4278	1123.6
9	0.276	729.5
10	0.2256	583.1
Abso	orbancia de blanco: 0.0573	

#### Tabla 68. Simulación de datos en concentraciones de muestras VN2

Software: Quantum XL Banyan Tree Engine (Rocket mode) generación de números aleatorios: Mersenne Twister 10000 Simulaciones en 0,10 segundos

Variables de entrada		Percentiles			
b2	Media	Desvío estándar		Máximo	423.61
Distribución: Normal	-0.00017867	2.90853E-07	9	99.9999%	423.39
b1	Media	Desvío estándar	9	99.999%	421.46
Distribución: Normal	0.021278	1.13768E-05	9	99.99%	402.15
b0	Media	Desvío estándar	9	99.95%	389.28
Distribución: Normal	0.08722	8.09701E-05	9	99.90%	381.36
blk	Media	Desvío estándar	9	99.50%	344.54
Distribución: Normal	0.07629	0.01512		99%	326.74
	Media	Desvío estándar	9	95%	277.70

#### MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA AL ANÁLISIS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN CONTENIDO GÁSTRICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA, PARA LA CONFIRMACIÓN DE INTOXICACIONES POR FOSFURO DE ALUMINIO

#### **Carlos Iván Roque**

Distribución: Normal	0.0639	0.0196	90%	251.92
	•	<u> </u>	80%	218.68
Resultados		]	75%	206.39
Número de simulaciones	10,000		70%	194.79
Media (mg/L)	155.78		60%	174.90
Desvío estándar (mg/L)	74.49		50%	155.76
Mediana (mg/L)	155.76		40%	137.44
Límite de decisión (mg/L)	300		30%	117.06
KS Test p-Value (Normal)	>0.15		25%	105.93
Valores simulados mayores al límite de decisión	250		20%	93.36
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			10%	60.03
Histograma de VN			5%	33.41
400 -	300 n	ng/L	1%	-22.45
350 -			0.50%	-38.39
250 -			0.10%	-70.68
200 - 150 -			0.05%	-102.46
100 -			0.01%	-149.16
			0.001%	-156.30
151' 100' M 10 W 12 VI W 13' W 10' W 10' W 10' W 10' W 10' W	249. 1218. 301. 336. 36	5. 39A.6	0.0001%	-157.02
			Mínimo	-157.10

Se observa que menos de un 5% de los datos son superiores al límite de decisión. Cerca de un 20% no sobrepasa el límite de detección.

La probabilidad de que una muestra negativa verdadera tenga una concentración mayor a 300 mg/L es de 2,6%

Por el método determinístico ninguna de las muestras VN2 resultó con una concentración mayor de 300 mg/L

## Simulación de datos para muestras positivas verdaderas (VP)

Previo a la simulación para el grupo VP fue necesario verificar la normalidad de los datos para poder efectuar inferencias adecuadas

TEST DE GRUBBS			Prue	eba de r	normalid	ad para o	onjunto	de absor Nori	bancias e mal	n muest	tras pos	itivas verdad	eras (VP)
	Dato extremo		95 -	     					/			Mean StDev	0.2532 0.06780
A (máx)	0.4278		90 -				+		/			N AD	10 0.904
			80 -			11	1				TT	P-Value	0.013
Tamaño de muestra	10	entaje	60 - 50 -				• /				+ + + + + + + + + + + + + + + + + +		
media	0.2532	Por	40 - 30 -					 			$\frac{1}{1} = -\frac{1}{1}$		
Desvío estándar	0.0678		20 -			/•	+	+	   				
			5 -		/	<b>¦-</b> -¦							
G <sub>exp</sub>	6.33		1	0.10	0.15	0.20	0.25	0.20	0.25	0.40			
G <sub>tabla</sub>	2.29			0.10	0.15	0.20	0.25 VF	0.30	0.35	0.40	0.45		

Tabla 69.	Pruebas de	normalidad	para grupo	de absorban	cias VP
10010 001		nonnanaaa	para propo		



#### Ilustración 46. Gráfico de normalidad y Test Anderson-Darling después de eliminar dato atípico



#### Tabla 70 Simulación de datos en concentraciones de muestras VP

Software: Quantum XL Banyan Tree Engine (Rocket mode) Generación de números aleatorios: Mersenne Twister 10000 Simulaciones en 0,10 segundos Variables de entrada Percentiles Media Desvío estándar Máximo 1002.09 b2 Distribución: Normal -0.00017867 2.90853E-07 99.9999% 1001.89 00 000% 1000.06 **b1** Media Desvío estándar Distribución: Normal 0.021278 1.13768E-05 b0 Media Desvío estándar Distribución: Normal 0.08722 8.09701E-05 blk Media Desvío estándar Distribución: Normal 0.0763 0.0151 Media Desvío estándar Avp 0.2338 0.0306 Distribución: Normal

Resultados	
Número de simulaciones	10,000
Media (mg/L)	661.61
Desvío estándar (mg/L)	98.78
Mediana (mg/L)	661.62
Límite de decisión (mg/L)	300
KS Test p-Value (Normal)	>0.15
Valores simulados menores al límite de decisión	2



55.55576	1000.00
99.99%	981.80
99.95%	968.83
99.90%	947.57
99.50%	908.00
99%	887.19
95%	823.63
90%	787.55
80%	746.24
75%	728.83
70%	714.09
60%	687.27
50%	661.62
40%	635.43
30%	610.32
25%	596.55
20%	578.76
10%	534.36
5%	498.70
1%	428.21
0.50%	398.96
0.10%	336.39
0.05%	316.01
0.01%	299.41
0.001%	295.70
0.0001%	295.33
Mínimo	295.28



Se observa que menos de un 0,05% de los datos son inferiores al límite de decisión. Cerca de un 0,01% no sobrepasa el límite de cuantificación. La probabilidad de que una muestra positiva verdadera tenga una concentración menor a 300 mg/L es de 0,013%

Por el método determinista ninguna de las muestras VP resultó con una concentración menor de 300 mg/L

Tabla 71. Tabla de contingencia basada en ensayos a muestras reales			
	Resultados de ensayo		
	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Verdaderos negativos (VN2)	6	0	6
	vn	fp	vn + fp
Verdaderos positivos (VP)	0	10	10
	fn	vp	fn + vp
TOTAL	6	10	16
	vn + fn	fp + vp	Т

#### Tabla 71.Tabla de contingencia basada en ensayos a muestras reales

Índice de falsos positivos	0
Índice de falsos negativos	0
Sensitividad	100%
Especificidad	100%
Eficiencia	100%

	Resultados de ensayo		
	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Verdaderos negativos (VN2)	9750	250	10000
	vn	fp	vn + fp
Verdaderos positivos (VP)	2	9998	10000
	fn	vp	fn + vp
TOTAL	9752	10248	20000
	vn + fn	fp + vp	Т

#### Tabla 74. Parámetros cualitativos de desempeño basados en simulaciones

Índice de falsos positivos	0.0244
Índice de falsos negativos	0.0002
Sensitividad	99.98%
Especificidad	97.50%
Eficiencia	98.74%



Los parámetros cualitativos definidos de forma determinista muestran un método cualitativo, basado en una medición, sin defectos. Estos parámetros pueden tener un sesgo importante si se toma en cuenta el número reducido de muestras.

Los datos resultantes de los experimentos de simulación evidencian un riesgo de falsos positivos y de falsos negativos de 2,44% y 0,02% respectivamente.

Se considera que el método tiene una selectividad adecuada con una probabilidad de falsos positivos menor al 5% y un riesgo de falsos negativos menor al 5%, por lo que se demuestra que el método desarrollado es apropiado para su propósito.

## Evaluación de posibles falsos negativos

Un tercer grupo de muestras que se identificaron como dudosas debido a que no se dispuso de suficientes elementos de prueba para aseverar que pertenezcan a los grupos de verdaderos positivos. Estas muestras fueron remitidas al Laboratorio Químico Toxicológico con el fin de ser analizadas bajo la sospecha de intoxicación por fosfuro de aluminio, pero no se detectó la presencia de fosfina en el ensayo químico, incluso en algunas no se hizo referencia a hallazgos que fundamenten esta hipótesis. Los resultados de estas muestras se presentan en la **Tabla 75** 

<i>nu 7</i> .	a 75. Resultados en maestras adalosas, posiblemente raisos negati		
	A/s	Concentración (mg/L)	
1	0.1114	242.9	
2	0.0864	168.1	
3	0.0692	116.8	
4	0.0604	90.6	
5	0.0454	45.9	

#### Tabla 75. Resultados en muestras dudosas, posiblemente falsos negativos

Ninguna de las muestras puede ser reportada como positiva en base al límite de decisión.

Efectuando un experimento de simulación se obtiene lo siguiente:

Número de simulaciones	10,000
Media (mg/L)	189.48
Desvío estándar (mg/L)	88.88
Test de normalidad, valor p	>0.15
Valores simulados mayores al límite de decisión	1090

Tabla 76. Datos en concentraciones obtenidos por simulación con muestras dudosas

Para este grupo la probabilidad de que una muestra positiva verdadera tenga una concentración mayor a 300 mg/L es de 10,7%. Por el método determinista ninguna de las muestras resultó con una concentración mayor de 300 mg/L



Las muestras identificadas como "**posibles falsos negativos**" fueron definidas como tales por la historia médico-legal, pero no se conocen detalles como tratamientos de desintoxicación (por ejemplo lavado gástrico), manifestaciones como vómitos intensos, dosis ingerida y el estado del producto ingerido (algunas personas han ingerido tabletas en avanzado estado de degradación, en estos casos hay una proporción considerable de hidróxido de aluminio que precipita en el estómago formando compuestos poco solubles) Estos factores entre otros abren la posibilidad de **falsos negativos clínicos**.

Existen otras incógnitas en la manipulación preanalítica de los especímenes. El método de recolección durante la autopsia, el embalaje la preservación y la ocurrencia de accidentes relativamente comunes como por ejemplo derrames, pueden dar lugar entre otros factores a **falsos negativos analíticos**.

Para asegurar la calidad del método, estos factores deben ser siempre tomados en cuenta una vez implementado el método en el laboratorio.



# 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- **6.1.** En base a los ensayos realizados y los resultados obtenidos se demuestra que ha sido desarrollado un método analítico apto para la confirmación de intoxicaciones por ingesta de fosfuro de aluminio, cumpliendo todos los parámetros de desempeño dentro de los criterios de evaluación establecidos
- **6.2.** Se han resuelto adecuadamente los problemas analíticos antes presentados, identificando los factores críticos aplicando herramientas cualimétricas e implementando buenas prácticas en la manipulación preanalítica de los especímenes
- **6.3.** Se estimó un límite de decisión eficaz que permite diferenciarlos valores de aluminio elemental en contenidos gástricos considerados como normales de las concentraciones de muestras extraídas de individuos que ingirieron fosfuro de aluminio.
- **6.4.** Se recomienda reforzar este límite de decisión con un número mayor de especímenes biológicos. El Laboratorio Químico Toxicológico debe tomar en cuenta los aspectos analíticos y clínicos que pueden llevar a falsos negativos en la práctica.



# 7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES





# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

<sup>1</sup> Ruíz, J.M. Centro Nacional de Toxicología, Centro Nacional de Prevención y Control de Sustancias Tóxicas, Dirección General de Salud Ambiental y Epidemiología. Managua, Nicaragua C.A. "Resumen de Intoxicaciones Agudas por Fosfuro de Aluminio. Nicaragua Año 1995 – 2004" [en línea] URL disponible en:

http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=297

<sup>2</sup> Soltaninejad, K. PhD, Faryadi M. MSc y Sardari F. DLS. (2007) "Acute pesticide poisoning related deaths in Tehran during the period 2003 – 2004". *Journal of Forensic and Legal Medicine* **14** p. 352 – 354

<sup>3</sup> Singh, B., y Unnikrishnan. (2006) "A profile of acute poisoning at Mangalore (South India)". *Journal of Clinical Forensic Medicine* **13** p. 112 – 116

<sup>4</sup> Hajouji M., Oualili L., Abidi K., Abouqal R., Kerkeb O., Zeggwagh A.A. (2006) "Facteurs de gravité de l'intoxication aigüe au phosphure d'aluminium (Phostoxin <sup>®</sup>)". *Annales Françaises d'Anesthesie et de Réanimation*. 25, p. 382 – 385

<sup>5</sup> Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, London (2006) *Pharmaceutical Press*. Versión electrónica. [citada en 2007 julio 24] <u>http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke</u>

<sup>6</sup> Salavarría, G, Caballero H., Alvarenga M. Y Roque C. "*Desarrollo y validación de un método analítico alterno para la confirmación de intoxicaciones con fosfuro de aluminio*" Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras (2003)

<sup>7</sup> Singh, D., Dewan, I., Avadh N. P. y Tyagi S. (2003) "Spectrum of unnatural fatalities in the Chandigarh zone of northwest India – a 25 year autopsy study from a tertiary care hospital". *Journal of Clinical Forensic Medicine* 10, p. 145 – 152

<sup>8</sup> Kishi, M. MD, Dr PH. "IFCS Acutely Toxic Pesticides". *JSI Reseca and Training Institute Inc.*, Junio **6**, 2002.

<sup>9</sup> Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Carrera de Sociología. Observatorio de la Violencia. (agosto 2007) "Observatorio de la Violencia, Mortalidad y Otros". Edición N° 6. Boletín enero – marzo 2007

<sup>10</sup> Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. (2001) "Toxicología de Plaguicidas", Manual de Capacitación. OPS/OMS. Nicaragua. P.4



<sup>11</sup> University of California-Davis, Oregon State University, Michigan State University, Cornell University, and the University of Idaho. "EXTOXNET - The extension toxicology network" [fecha de acceso 10 de agosto del 2004]; URL disponible en: <u>http://extoxnet.orst.edu/pips/alumphos.htm</u>

<sup>12</sup> Office of Environmental Health Hazard Assessment. "Phosphine CHRONIC TOXICITY SUMMARY **PHOSPHINE** (hydrogen phosphide; phosphorus trihydride; Celphos; Phostoxin)" [fecha de acceso 8 de febrero de 2007]; URL disponible en: <u>http://www.oehha.ca.gov/air/chronic\_rels/pdf/7803512.pdf</u>.

 $^{13}$  DUA, R. y GILL, K. D. (2004) "Effect of aluminium phosphide exposure on kinetic properties of cytochrome oxidase and mithocondrial energy metabolism in rat brain". *Biochimica et Biophysica Acta* **1674**, p 4 – 11

<sup>14</sup> Musshoff F., J. Preuss, E. Lignitz, B. Madea. (2008) "A gas chromatographic análisis of phosphine in biological material in a case suicide". Forensic Science Internacional. 177, p. e35 – e38.

<sup>15</sup> MHA, Goverment of India. "Directoriate of Forensic Science". India., P. 218

<sup>16</sup> Raina, A., Shrivastava H.C., Mathur N., Dogra T. D. (2004) "Validation of qualitative test for phophine gas in human tissues". *Indian Journal of experimental biology*. 41, p. 909 – 911

<sup>17</sup> BASELT, PH.D., RANDALL C. *"Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man"* **2000**. 5<sup>o</sup> edición, Chemical Toxicology Institute, Foster City, California, U.S.A.

<sup>18</sup> Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department Of Health And Human Services, Public Health Service. (**2006**) "*Draft Toxicological for Aluminum*". Atlanta, Georgia, U.S.A. p 229 - 244

<sup>19</sup> Gitelman, H., Alderman, F. (**1989**) "Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Determination of Aluminium: Elimination of Serum Matrix Effects". *Clinical Chemistry*. 35/7, 1517 – 1519.

<sup>20</sup> ROUESSAC, F., ROUESSAC, A. *"Chemical Anaylisis, Modern Intrumentation Methods and Techniques"*. Traducción por Steve Brooks, Francis y Annick Rouessac. 2<sup>e</sup> edición. **2007**. John Wiley & Sons, Ltd. Londres, Inglaterra.

<sup>21</sup> BUTCHER, D., SNEDDON, J. *"A Practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry"*. 1**998**. John Wiley & Sons, Inc, United States of America.

<sup>22</sup> BAYER. (Fecha en vigencia: enero 2003). "Hoja de datos de seguridad, Detia Gas". Bayer Enviromental Science. Degesch de Chile, Ltda. Santiago, Chile.



<sup>23</sup> FAX, *"Fosfuro de aluminio, KILLPHOS"*. FAX MÉXICO, S.A: de C.V." México.

<sup>24</sup> FUGRAN, Comercial e Industrial S.A. "*Phostoxin*®", [en línea]; [Fecha de acceso 31 de agosto de 2007]; URL: <u>http://www.fugranarg.com.ar/docs/productos\_phostoxin.htm</u>

<sup>25</sup> "Aluminum Phosphide, 55-60% Tablet/pellet (MSDS) (Label) (Direction for Application)" [en lñinea]; [Fecha de acceso: 31 de agosto de 2007];
 URL: <u>http://www.penglaichem.com/OLDPAGE/Aluminum%20Phosphide.htm</u>

<sup>26</sup> INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). (2006) "Atomic
 Weights of the Elements 2005 (IUPAC Technical Report)". *Pure Applied Chemistry*, Vol 78, **11**, p. 2051 – 2066

<sup>27</sup> Dabbs, D., Ramachandran, U., Lu, S., Liu, J., Wang, L., Aksay, I., (2005)"Inhibition of Aluminum Oxyhydroxide Precipitation with Citric Acid", *Langmuir*, **21**, p. 11690-11695

<sup>28</sup> Taylor, A., Branch, S., Halls, D., Owen, L., y White M. (1998) "Atomic Spectrometry Update – Clinical and biological materials, food and beverages". *Journal of Analytical Spectrometry*, **13**, p. 57 – 106.

<sup>29</sup> Harris, W. (1992), "Equilibrium Model for Speciation of Aluminum in Serum". Clinical Chemistry Journal, **38/9**, p. 1809 – 1818

<sup>30</sup> Comos, J. M. "*Determinación de Aluminio en Líquidos Concentrados de Hemodiálisis por Espectrofotometría de absorción Atómica*", memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. (2001) 179p.

<sup>31</sup> KARCH, S.,(2007) "Postmortem Toxicology of Abused Drugs", CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, U.S.A.

<sup>32</sup> Peters, F., Drummer, O., Musshoff, F. (2007) "Validation of new methods". Forensic Science International, **165**, p. 216 – 224

<sup>33</sup> Moffett, J. (2000) "Why calibration graphs curve in atomic absorption spectrometry" Varian Australia, **AA-128**.

<sup>34</sup> BROEKAERT, J. (2002), "Analytical Atomic Spectrometry with Flamees and Plasmas", Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.

<sup>35</sup> MITRA, S., (2003) "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 472 p



<sup>36</sup> Gonçalves, C., Alves, K., Rocha, C., da Silva, J., (2002) "Direct determination of aluminium in serum and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using ruthenium as permanent modifier", *Analytica Chimica Acta*, 464, p. 323 – 330.

<sup>37</sup> Brown, S.m Bertholf, R., Wills, M., Savory, J., (1984) "Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Determination of Aluminum in Serum with a New Technique for Protein Precipitation"., clinical chemistry, **30/7**, p. 1216 – 1218.

38 Koscielniak, P., (1999), "Nonlinear calibration by the Standard addition method", *Chemometrics and Inteligent Laboratory Systems*, **47**, p. 275 – 287

39 Steliopoulos, P., Stickel, E., Haas, H., Kranz S., **(2006)**, "Method validation approach on the basis of a quadratic regression model", *Analytica Chimica Acta* **572** p. 121–124

40 Vankeerberghen, P., Smeyers-Verbeke, J., **(1992)** "The quality coefficient as a tool in decisions about the quality of calibration in graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **15** P.195–202.

<sup>41</sup> ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL PARA LA NORMALIZACIÓN, ISO/IEC 17025(ES),(2005), Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración", *Norma Internacional*, Ginebra, 2º edición.

<sup>42</sup> VARIAN (2003), "Graphite Tube Atomizer, Operation manual". Varian Inc., 8510118500. Australia.

<sup>43</sup> VARIAN (2004), "Programable Sample Dispenser (PSD120), Operation manual". Varian Inc.,
 8510121800. Australia