

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN- LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESCUELA DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS DE DROGAS Y MEDICAMENTOS



CUANTIFICACIÓN DE HIERRO ELEMENTAL EN TABLETAS DE SULFATO FERROSO
APLICANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA, DURANTE
EL AÑO 2010.

TRABAJO DE DIPLOMA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO-FARMACÉUTICO.

Autores:

- Br. Marcela de La Concepción Pacheco Hernández.
- Br. Karen Marbeli Peralta Padilla.

Tutor:

- Msc. Fernando Emilio Baca Escoto.

Asesor:

- Lic. Yader Benito Salgado Mercado.

León, Junio del 2010.



A mi familia por su esfuerzo y empeño.

A Randolph por su apoyo y estímulo.

M.C.P.H.

A mis padres por su continuo buen ejemplo.

A mis hermanas por apoyarme y animarme.

K.M.P.P.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y permitir que yo llegará hasta aquí.

A mi madre por el esfuerzo que ha hecho por brindarme una mejor educación, por su apoyo y entendimiento durante los años que ha durado este camino de lograr mi título profesional.

A Randolph por su comprensión, su estímulo a seguir adelante, y por contar siempre con su apoyo cuando más lo necesitaba.

Al Lic. Yader Salgado por brindarme su ayuda, sus conocimientos y sus consejos que han facilitado el trabajo. Tengo que agradecerle la dedicación de su ya muy comprometido tiempo, y de una forma muy especial su carácter y simpatía.

M.C.P.H.

A Dios en primer lugar porque me dio las fuerzas necesarias, me proveyó siempre de lo que necesitaba y me dio la salud para poder culminar mis estudios a pesar de los obstáculos que encontré en el camino.

A mis padres por su apoyo brindado y los ánimos que siempre me dieron para que siguiera adelante y no me rindiera a medio camino, en especial a mi madre que fue mi motivo y mi ejemplo a seguir para que estudiara y terminara mis estudios.

A mis hermanas y tías que siempre estuvieron conmigo ayudándome y animándome a lo largo de mis estudios.

Le agradezco al Lic. Yader Salgado Mercado que estuvo a lo largo de esta monografía ayudándome y apoyándome con sus conocimientos.

K.M.P.P.



ÍNDICE

	Páginas
TEMA.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	7
MARCO TEÓRICO.....	9
I. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	
1. Generalidades.....	10
2. Fundamentos de la Espectrofotometría.....	11
3. Absorción de la Radiación Electromagnética.....	12
4. Emisión de la Radiación Electromagnética.....	14
5. Espectrofotometría de Absorción Atómica.....	14
6. Instrumentación para Absorción Atómica.....	17
7. Interferencias en Espectrofotometría de Absorción.....	28
II. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	
1. Generalidades.....	31
2. Parámetros a evaluar para validar un método.....	34
3. Linealidad y Rango.....	34
4. Precisión.....	40
5. Exactitud.....	46
6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	49
7. Robustez.....	54
III. INCERTIDUMBRE	
1. Definición.....	57



2. Componentes de la Incertidumbre.....	57
3. Error e Incertidumbre.....	57
4. Proceso de estimación de la medición de la incertidumbre.....	58
IV. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SULFATO FERROSO.....	67
V. PROPIEDADES FÁRMACO-TERAPÉUTICAS DEL SULFATO FERROSO.....	69
DISEÑO METODOLÓGICO (MATERIAL Y MÉTODO).....	73
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	80
CONCLUSIONES.....	94
RECOMENDACIONES.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS.....	100



TEMA



Cuantificación de hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso aplicando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, durante el año 2010.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



¿Cuál es la cantidad de hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso aplicando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, durante el año 2010?



INTRODUCCIÓN



La validación de un proceso analítico enmarca una serie de parámetros que deben incluir evidencia documentada de la aptitud de los materiales, del funcionamiento y confiabilidad del equipo y de los sistemas, adecuación de las instalaciones y competencia del personal que proporciona procesos exactos, seguros y con un nivel de confianza, al mismo tiempo recopila datos suficiente que permite interpretar una medida estadística válida.

En nuestro país la búsqueda de nuevos métodos obedece a la falta de recursos y equipos, sin que estos no descuiden la calidad de resultados obtenidos de ellos. Con este fin la validación de métodos nos permite respaldar científicamente por estudios de laboratorio, la calidad y capacidad de los mismos. Es por eso que la industria farmacéutica requiere de mayores exigencias en los análisis de control de calidad de los medicamentos.

Existen ensayos realizados en otros países en los que se ha determinado Hierro elemental en arroz y harina. En Nicaragua no se encontraron estudios en los que se documenten ensayos realizados en formas farmacéuticas para la cuantificación de hierro mediante la técnica de Absorción Atómica, es por eso que con este estudio se pretende demostrar que los resultados obtenidos en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-León, tomando en cuentas parámetros de la validación, proporcionen datos exactos, precisos y con un grado de confiabilidad en matrices como tabletas.

Por esta razón es necesaria la implementación de un método de análisis cada vez más preciso que proporcione la garantía de estos productos, además el método analítico descrito por la farmacopea refiere la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, la cual se aplica para el análisis elemental de soluciones y es de gran utilidad en la determinación y cuantificación de metales en diversas matrices, aun en presencia de otros elementos, obteniéndose el contenido total del metal en la muestra aún en concentraciones muy bajas, cuando se trata de formas farmacéuticas. Por lo tanto, este nuevo método de análisis cuantitativo de hierro en tabletas de sulfato ferroso permite disminuir costos respecto a la adquisición de reactivos empleados en la farmacopea, así como la preservación del equipo que a la industria farmacéutica la beneficiaría directamente sin perder las exigencias y criterios de calidad.

Por lo antes expuesto se puede decir que este método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, evaluando parámetros como linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y la incertidumbre a como lo establece la norma ISO/IEC 17025:2005, dejando a su vez un aporte bibliográfico que sirva de apoyo para obtener información y conocimientos necesarios a generaciones futuras.



OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL:

- Cuantificar hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso aplicando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, durante el año 2010.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Cuantificar hierro elemental presente en las tabletas de sulfato ferroso por espectrofotometría de absorción atómica.
- Determinar linealidad, precisión y exactitud del método para la cuantificación de hierro elemental aplicando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica.
- Evaluar la incertidumbre del método.



MARCO TEÓRICO



I. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

1. GENERALIDADES.

La espectrometría es el conjunto de técnicas que utiliza la luz para medir concentraciones químicas. Estos fenómenos están asociados con cambios en los estados de energía de las diferentes especies. Por consiguiente, dado que cada especie posee estados energéticos característicos, la espectrofotometría puede utilizarse para identificarlos.

La espectrofotometría constituye la base del análisis espectro químico, en el que la interacción de la radiación electromagnética con la materia se utiliza para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra.

La espectroscopía de absorción atómica se basa en la absorción de luz por los átomos de un elemento a cuantificar en una muestra, cuando se hace incidir en ella un haz de luz emitido por una lámpara con una rigurosa longitud de onda definida, la cual corresponde a la longitud de onda de emisión característica del elemento particular escogido para el análisis.

La extensión a la cual la luz es absorbida provee una estimación de la concentración del elemento en la muestra, la cual debe estar en solución. Por lo cual requiere un tratamiento previo, para que sea atomizada en una flama o electrotérmicamente, la intensidad del rayo de luz emergente, después de la absorción por la muestra, es medida para determinar su absorción.

- La absorción atómica es una técnica común para detectar metales y metaloides en muestras de cualquier tipo de matriz: ambientales, aguas, suelos, aire, así como alimentos, muestras minerales, productos químicos, aleaciones y fundiciones, etc.
- Es bastante simple y confiable.
- La técnica se basa en el hecho de que la mayoría de los metales absorben luz a longitudes de onda específica.
- Los iones metálicos contenidos en una solución son convertidos a su estado atómico mediante el uso de una flama, de un generador hidruros más flama, vapor frío o electrotérmicamente por horno de grafito.
- Se emplea una fuente de luz apropiada a una determinada longitud de onda y la cantidad de luz absorbida puede ser medida interpolando en una curva de calibración.



2. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA.

2.1. Teoría Atómica de Bóhr (1913).

Los electrones alrededor del núcleo (ver figura 1 en anexos) están en niveles bien definidos, con un número limitado de ellos. **Un electrón puede saltar** de una órbita a otra **absorbiendo** (si va hacia una órbita más exterior) o **emitiendo** (en caso contrario). Un cuanto de radiación electromagnética de energía es igual a la diferencia existente entre los estados de partida y de llegada.

2.2. Propiedades de la Radiación Electromagnética.

La radiación electromagnética es una forma de energía que se transmite por el espacio a enorme velocidad. La radiación electromagnética puede describirse como una onda con propiedades de longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud. En contraste con las ondas sonoras, la luz no requiere un medio de soporte para su transmisión, de modo que se propaga fácilmente en el vacío. Además viaja a una velocidad casi un millón de veces mayor que la del sonido. El modelo de onda no explica fenómenos relacionados con absorción y emisión de la energía radiante. En relación con estos procesos, se puede considerar a la radiación electromagnética como paquetes discretos de energía o partículas llamados fotones o cuantos. Estas dos consideraciones de la radiación como partículas y ondas no son excluyentes entre sí, sino más bien complementarias. De hecho, la energía de un fotón es directamente proporcional a su frecuencia. De manera similar, esta dualidad se aplica al flujo de electrones, protones y otras partículas elementales, que pueden producir efectos de interferencia y difracción habitualmente relacionados con el comportamiento de las ondas.

La radiación electromagnética puede interactuar con la materia de diferentes maneras. Si el haz de radiación transfiere energía a la materia se dice que ocurre una **absorción** de la radiación. El proceso inverso, el que ocurre cuando parte de la energía interna de la materia es convertida en energía radiante, se llama proceso de **emisión**. Ambos fenómenos son sumamente importantes en espectrofotometría.

La radiación electromagnética tiene propiedades ondulatorias y corpusculares. Los fenómenos de refracción, reflexión, dispersión, etc. Son explicables considerando la radiación electromagnética como ondas.

El efecto fotoeléctrico sugiere que la radiación electromagnética también tiene comportamiento corpuscular y que ésta radiación consiste de partículas discretas llamadas **fotones**, los cuales tienen energías definidas y se desplazan a la velocidad de la luz.



3. ABSORCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.

Cuando una molécula absorbe un fotón aumenta la energía de la molécula. Se dice que la molécula ha pasado a un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, disminuye la energía de la molécula. El estado de mínima energía molecular se llama estado fundamental.

Cuando una muestra absorbe luz, la irradiancia del haz de luz disminuye. La irradiancia P , es la energía por segundo por unidad de área del haz de luz. La luz se hace pasar a través de un monocromador (prisma, red de difracción o incluso un filtro) para seleccionar una longitud de onda. La luz de una sola longitud de onda se llama monocromática o sea de un color.

La Transmitancia T , se define como la fracción de luz incidente que pasa a través de la muestra.

$$\text{Transmitancia} \quad T = \frac{P}{P_0} \quad (\text{Ec. 1})$$

Por tanto, T puede valer de 0 a 1. El porcentaje de Transmitancia es simplemente $100T$ y puede valer desde 0 a 100%. La absorbancia se define como:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T \quad (\text{Ec. 2})$$

La absorbancia es importante porque es directamente proporcional a la concentración c , de la especie que absorbe luz en la muestra.

$$\text{Ley de Beer:} \quad A = \epsilon bc \quad (\text{Ec. 3})$$

La ecuación, que es el fundamento de la espectrofotometría, se denomina **ley de Lambert-Beer** o simplemente **Ley de Beer**. La absorbancia es adimensional, pero algunos escriben “unidades de absorbancia” después de la absorbancia. La concentración de la muestra c , normalmente viene dada en unidades de mol/L (M). El camino óptico b , normalmente se expresa en centímetros. La cantidad ϵ (epsilon) se llama absorptividad molar (o coeficiente de extinción en libros antiguos, y tiene unidades como $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y así el producto ϵbc , es adimensional). La absorptividad molar es la característica de una sustancia que nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada. La cantidad ϵ es simplemente un



coeficiente de proporcionalidad entre la absorbancia y el producto bc . Cuanto mayor es la absorptividad molar, mayor es la absorbancia.

- **Casos en los que no se cumple la ley de Beer.**

La ley de Beer afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Esta ley se aplica a radiación monocromática, y funciona muy bien con disoluciones diluidas ($\leq 0.01M$) de la mayoría de las sustancias.

En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto interactúan entre sí debido a su proximidad. Cuando las moléculas del soluto se aproximan entre sí, sus propiedades (entre las que se encuentra la absorptividad molar) cambian algo. A concentraciones muy altas, los solutos se convierten prácticamente en disolvente. Las propiedades de una molécula no son exactamente las mismas en diferentes disolventes. Los solutos de una disolución que no absorben también pueden interactuar con las especies absorbentes y alterar la absorptividad. Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absorptividad cambia con la concentración, por tanto esta no obedecerá a la ley de Beer cuando se diluya.

3.1. Espectros de Absorción.

Cuando una molécula absorbe un fotón pasa a un estado excitado de mayor energía, y al revés, cuando una molécula emite un fotón, disminuye su energía en un valor igual a la energía del fotón. Los orbitales moleculares describen la distribución de electrones en una molécula, del mismo modo que los orbitales atómicos describen la distribución de electrones en un átomo. En toda transición electrónica se produce un salto de un electrón de un orbital a otro, con el consiguiente aumento o disminución de la energía de la molécula.

El **espectro** se define como una representación gráfica o fotográfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. Los espectros son debidos a transiciones entre estados de energía característicos de la materia.

Los espectros pueden ser de emisión, que se obtienen excitando adecuadamente la materia para que emita radiación electromagnética y de absorción, obtenidos sometiendo a la materia a una radiación electromagnética continua y representando la proporción de radiación absorbida por la misma en función de la frecuencia o longitud de onda.

3.1.2. Absorción Atómica.

El espectro consta de diversas líneas de absorción muy pronunciadas cuando se registra con un espectrofotómetro de muy alta resolución. Estas excitaciones son el resultado de la absorción de fotones de radiación cuya energía guarda correspondencia exacta con las diferencias de energía entre los estados excitados y el estado fundamental $3s$. Las



transiciones entre dos orbitales distintos se llaman transiciones electrónicas. Los espectros de absorción atómica generalmente no se registran, debido a las dificultades instrumentales. En su lugar, se mide la absorción atómica a una sola longitud de onda con una fuente monocromática.

4. EMISIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.

Los átomos, iones y moléculas pueden excitarse a uno o más niveles de energías superiores con distintos procesos, incluidos el bombardeo con electrones u otras partículas elementales; la exposición a plasmas, llamas o arcos eléctricos de alta temperatura; o la exposición a una fuente de radiación electromagnética. La duración de la especie excitada suele ser transitoria (10^{-9} y 10^{-6} s), y ocurre la rebajación a un nivel de energía inferior o al estado fundamental con la liberación del exceso de energía en la forma de radiación electromagnética, calor o quizás ambos.

4.1. Espectros de emisión.

La radiación de una fuente se caracteriza de manera conveniente con un espectro de emisión, que generalmente tiene la forma de una gráfica de energía relativa de la radiación emitida en función de la longitud de onda o frecuencia.

Tres tipos de espectros se sobreponen: **espectro de líneas, espectro de bandas y espectro continuo**. El espectro de línea se compone de una sucesión de picos afilados y bien definidos, resultantes de la excitación de átomos específicos. El de bandas consiste en varios grupos de líneas, muy poco espaciadas por lo que no se resuelven por completo. La fuente de las bandas corresponde a moléculas de radicales pequeños en la fuente de llama. Por último, el espectro continuo, que se muestra como línea de guiones, origina el aumento en el fondo que aparece por encima de 350 nm. Los espectros de líneas y bandas se sobreponen al continuo.

5. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

5.1. Esencia del método.

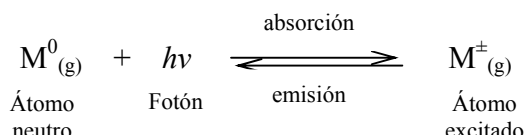
La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la propiedad que tienen los átomos neutros del elemento que se analiza, para absorber la energía luminosa (ver figura 2 en anexos) y en la correlación entre la intensidad de la absorción y la concentración de dicho elemento en la muestra objeto de análisis.

Para que ocurra el fenómeno de absorción es necesario, la presencia de átomos neutros no excitados del elemento que se va analizar, en forma de una nube gaseosa. Esto se logra mediante la utilización de un atomizador, en donde las muestras se vaporizan a una



temperatura de 2,000-3,000 °C. Estos átomos neutros así producidos, pueden absorber la energía luminosa de una longitud de onda determinada, proveniente de una fuente de radiación, y al hacerlo, se excitan un nivel energético superior. Después, los átomos excitados regresan a su estado base emitiendo la energía absorbida.

Los fenómenos de absorción y emisión se representan de la forma siguiente:



En Absorción Atómica y Emisión, la longitud de onda característica que usualmente se utiliza en la determinación de la mayoría de los metales, corresponde a la primera línea de resonancia, es decir, a la línea espectral de transición entre el estado base y el estado excitado de la menor energía. Esta línea generalmente es más intensa y proporciona mayor sensibilidad en el análisis.

Es importante tener presente que un átomo puede absorber o emitir energía luminosa a diferentes longitudes de onda. Por otro lado, si la llama posee suficiente energía, el átomo metálico puede ionizarse, y los iones pueden absorber y/o emitir energía de igual manera que lo hacen los átomos neutros.

Otros fenómenos que pueden ocurrir en la llama es que los átomos neutros pueden reaccionar con otras especies químicas presentes en la misma, y formar compuestos capaces de absorber y/o emitir energía luminosa.

5.2. Tipos de Espectrofotometría Atómica.

- Absorción:** se aspira una muestra hasta una llama, que se encuentra a altas temperaturas, el líquido se evapora, y las partículas sólidas resultantes se descomponen en átomos en la llama. Cuando se bombardea el cátodo con iones de Ne y Ar energizados, los átomos excitados se vaporizan y emiten luz de las mismas frecuencias de las que absorben los átomos en la llama, en donde hay un detector convencional para medir la cantidad de luz que pasa por la llama.
- Emisión:** las colisiones de átomos en un plasma muy caliente elevan los átomos a estados electrónicos excitados, desde donde pueden emitir fotones espontáneamente al volver a su estado fundamental. No se usa lámpara en esta técnica. La intensidad de emisión es proporcional a la concentración del elemento en la muestra.



- c. **Fluorescencia:** se irradia los átomos formados en la llama con un láser, que los eleva a un estado excitado, de donde pueden emitir fluorescencia al volver al estado fundamental. La fluorescencia atómica es potencialmente mil veces más sensible que la absorción atómica.

5.3. Tipos de Espectrofotómetros.

Muchos fabricantes ofrecen instrumentos de absorción atómica, los cuales están disponibles con diseños de haz sencillo y de doble haz. Las diferencias de complejidad y coste son considerables. En general, el instrumento debe ser capaz de proporcionar una anchura de banda lo suficientemente estrecha para que pueda aislar, para la medida, la línea elegida de las otras líneas que pueden interferir o disminuir la sensibilidad del análisis.

5.3.1. Instrumentos de haz sencillo.

Un instrumento característico de haz sencillo (ver figura 4 en anexos), consiste en varias fuentes de cátodo hueco (sólo se muestra una de ellas), un cortador o una fuente de alimentación de impulsos, un atomizador y un espectrofotómetro sencillo de red de difracción con un fotomultiplicador como detector. Así, la corriente oscura se anula con un obturador enfrente del detector. A continuación se hace el ajuste del 100 por 100 T con un blanco que se aspira en la llama o que se quema en un atomizador sin llama. Finalmente, se obtiene la transmitancia reemplazando el blanco por la muestra.

5.3.2. Instrumentos de doble haz.

En un instrumento de doble haz (ver figura 5 en anexos), el haz que proviene de la fuente de cátodo hueco se divide mediante un cortador reflectante, una mitad pasa a través de la llama y la otra mitad fuera de ella. Los dos haces se juntan mediante un espejo semiplataado y llegan a un monocromador de red Czerny-Turner; un tubo fotomultiplicador actúa como detector. La salida de éste se utiliza para alimentar un amplificador de cierre sincronizado con el movimiento del cortador. Se amplifica entonces la relación entre las señales de la referencia y de la muestra, y pasan al sistema de tratamiento de datos, que puede ser un medidor digital o un registrador de señal. Hay que resaltar que en los instrumentos de absorción atómica de doble haz, el haz de referencia no pasa a través de la llama, y, por consiguiente, no existe una corrección de la pérdida de potencia radiante debida a la absorción o dispersión de la radiación por la propia llama.



6. INSTRUMENTACIÓN PARA ABSORCIÓN ATÓMICA.

Los instrumentos para espectrofotometría de absorción atómica (ver figura 3 en anexos) consiste en:

- a. **Fuente de radiación:** emite una línea específica correspondiente a la necesaria para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.
- b. **Nebulizador:** aspira la muestra líquida, para formar pequeñas gotas para una atomización más eficiente.
- c. **Quemador:** en el cual por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión misma, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.
- d. **Sistema óptico:** separa la radiación de longitud de onda de interés, de todas las demás radiaciones que entran a dicho sistema.
- e. **Detector ó transductor:** es capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente. Consta de un **amplificador** o sistema electrónico, que como su nombre lo indica amplifica la señal eléctrica producida, para que en el siguiente paso pueda ser procesada con circuitos y sistemas electrónicos comunes.
- f. **Sistema de lectura:** la señal de intensidad de corriente, es convertida a una señal que el operario pueda interpretar (ej.: concentración o absorbancia, etc.). Este sistema de lectura, puede ser una escala de aguja, una escala de dígitos, un graficador, una serie de datos que pueden ser procesados a su vez por una computadora, etc.

6.1. Fuentes de Radiación.

Los métodos analíticos basados en la absorción atómica son potencialmente muy específicos, ya que las líneas de absorción atómica son considerablemente estrechas (de 0,002 a 0,005 nm) y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento. Para que exista una relación lineal entre la señal analítica (absorbancia) y la concentración, es decir, que se cumpla la ley de Beer, es necesario que la anchura de banda de la fuente sea estrecha respecto a la anchura de un pico de absorción.

El problema creado por la limitada anchura de los picos de absorción atómica se ha resuelto empleando fuentes de líneas con anchuras de banda aún más estrechas que los picos de



absorción. Un inconveniente de esta técnica es la necesidad de una lámpara distinta para cada elemento (o a veces grupo de elementos).

La anchura de raya está regida por el efecto de la mecánica cuántica llamado **principio de incertidumbre de Heisenberg**, que dice que cuanto más breve es la vida de un estado excitado, más incierta es su energía relativa al estado fundamental. La anchura natural de raya de una señal de absorción o emisión atómica es 10^{-4} nm, debido a la breve vida del estado excitado.

Existen dos mecanismos que ensanchan las rayas en espectrofotometría atómica hasta 10^{-3} y 10^{-2} nm. Uno es el **efecto Doppler**: “Cuando un átomo se acerca a la fuente de radiación capta la onda electromagnética oscilante con más frecuencia que cuando se aleja de la fuente, es decir, cuando un átomo se mueve hacia la fuente «ve» la luz de mayor frecuencia que cuando se aleja de ella”.

La anchura de raya también está afectada por un **ensanchamiento por presión**, debido a las colisiones entre los átomos. Las colisiones acortan la vida del estado excitado. La incertidumbre de la frecuencia de las rayas de absorción y emisión atómica es aproximadamente igual en magnitud a la frecuencia de colisiones entre átomos, y es proporcional a la presión.

6.1.1. Lámparas de cátodo hueco.

La fuente más común para las medidas de absorción atómica es la lámpara de cátodo hueco (ver figura 6 en anexos). Este tipo de lámpara consiste en un ánodo de wolframio y un cátodo cilíndrico cerrados herméticamente en un tubo de vidrio lleno con neón o argón a una presión de 1 a 5 torr. El cátodo está construido con el metal cuyo espectro se desea obtener, o bien, sirve de soporte para una capa de dicho metal.

El cátodo es la terminal negativa y el ánodo es la positiva, cuando se aplica una diferencia de potencial entre las dos terminales ocurre una serie de eventos que son descritos a continuación:

Eventos que ocurren dentro de la LCH:

- Por efecto del voltaje aplicado entre los dos electrodos ocurre una descarga eléctrica.
- Estas descargas eléctricas aumentan la energía cinética y favorecen la ionización de las moléculas de gas inerte. Estas especies ionizadas requieren carga positiva, por lo cual son atraídas hacia el cátodo.



- Al chocar los iones de gas inerte (Ar^+ en este caso) con las paredes del cátodo, son desprendidos átomos del metal del que está en el cátodo o depositado sobre la superficie del mismo.
- Después de desprenderse del cátodo, los átomos producidos son excitados por choques moleculares con los iones y átomos de argón.
- Los átomos excitados no pueden permanecer indefinidamente en un estado de energía superior y procede el paso de emisión electromagnética.

A través de esta serie de procesos se obtiene un haz de radiación bien concentrado, ya que casi la totalidad de los eventos ocurren dentro del cátodo de la lámpara. El resultado final es la obtención de un espectro característico del elemento del que está hecho el cátodo de la lámpara.

La configuración cilíndrica del cátodo tiende a concentrar la radiación en una región limitada del tubo metálico; este diseño aumenta también la probabilidad de que la redeposición sea en el cátodo más que sobre las paredes de vidrio. La eficacia de la lámpara de cátodo hueco depende de su geometría y del potencial aplicado. Los potenciales elevados y, por consiguiente, las corrientes elevadas originan intensidades de radiación mayores.

6.1.2. Lámparas de descarga sin electrodos.

Las lámparas de descarga sin electrodos (EDL) son fuentes de espectros atómicos de líneas muy utilizadas y, por lo general, producen intensidades radiantes que son uno o dos órdenes de magnitud superiores a las lámparas de cátodo hueco. Una lámpara típica está constituida por un tubo de cuarzo herméticamente cerrado que contiene un gas inerte, como el argón, a unos pocos torr y una pequeña cantidad del metal (o su sal) cuyo espectro se desea obtener. La lámpara no contiene electrodos, pero, en su lugar, para su activación se utiliza un campo intenso de radiofrecuencia o radiación de microondas. De esta forma, se produce la ionización del argón, originándose iones que son acelerados por la componente de radiofrecuencia del campo hasta que adquieren la suficiente energía para excitar a los átomos del metal cuyo espectro se desea.

Las características más importantes de las lámparas de descarga sin electrodos (ver figura 7 en anexos) son:

- Solo se fabrican para elementos fácilmente vaporizables (As, Se, Sb, Pb, Sn, etc.).



- Producen líneas de alta intensidad que proporcionan una mayor sensibilidad para estos elementos.
- Requieren un generador de radiofrecuencia.
- Necesitan un mayor tiempo para estabilizarse que las de cátodo hueco.

6.1.3. Modulación de la fuente.

En un instrumento de absorción atómica típico es necesario eliminar las interferencias producidas por la emisión de radiación en la llama. La mayor parte de la radiación que se emite se elimina mediante el monocromador. Sin embargo, la radiación emitida correspondiente a la longitud de onda seleccionada por el monocromador está inevitablemente presente en la llama, debido a la excitación y emisión de los átomos del analito. A fin de eliminar los efectos de la emisión en la llama, es necesario modular la salida de la fuente para que su intensidad oscile a una frecuencia constante. De este modo, el detector recibe dos tipos de señal, una alternante de la fuente y otra continua que proviene de la llama. Estas señales se convierten en las correspondientes respuestas eléctricas. Para eliminar la señal de corriente continua no modulada y dejar pasar la señal de corriente alterna para su amplificación, se puede utilizar un simple filtro RC de vaso alto.

Una forma más sencilla y muy efectiva de modular la emisión de la fuente es interponer en el haz, entre la fuente y la llama, un disco metálico circular, o cortador, al que de forma alterna se le han eliminado cuadrantes para permitir el paso de luz. La rotación del disco a velocidad constante conocida proporciona un haz intermitente cortado a la frecuencia deseada. Como alternativa, el alimentador de la fuente puede diseñarse para funcionar con corriente alterna o de manera intermitente, para que la fuente se encienda y se apague a una frecuencia constante deseada.

6.2. Atomización de la muestra.

6.2.1. Atomización con llama.

En un atomizador de llama, la disolución de la muestra es nebulizada mediante un flujo de gas oxidante, mezclado con el gas combustible, y se transporta a una llama donde se produce la atomización. Una serie compleja de procesos encadenados tiene lugar en la llama. El primero es la **desolvatación**, en el que se evapora el disolvente hasta producir un aerosol molecular sólido finamente dividido. Luego la **disociación** de la mayoría de estas moléculas produce un gas atómico. La mayoría de los átomos así formados se **ionizan**



originando cationes y electrones. Indudablemente se producen también otras moléculas y átomos en la llama como resultado de las interacciones del gas combustible con el gas oxidante y con las distintas especies de la muestra. Una fracción de las moléculas, átomos e iones también se excita por el calor de la llama, produciéndose así espectros de emisión moleculares, atómicos e iónicos. Produciéndose tantos procesos complejos no es sorprendente que la atomización sea la etapa más crítica en la espectroscopia de llama y la que limita la precisión de dichos métodos. Debido a la naturaleza crítica de la etapa de atomización, es importante comprender las características de las llamas y las variables que afectan a dichas características.

6.2.1.1. Tipos de Llama.

Combustible	Oxidante	Temperaturas (°C)	Velocidad de combustión máxima (cm s ⁻¹)
Gas Natural	Aire	1,700-1,900	39-43
Gas Natural	Oxígeno	2,700-2,800	370-390
Hidrógeno	Aire	2,000-2,100	300-440
Hidrógeno	Oxígeno	2,550-2,700	900-1,400
Acetileno	Aire	2,100-2,400	158-266
Acetileno	Oxígeno	3,050-3,150	1,200-2,480
Acetileno	Óxido Nitroso	2,600-2,800	286

6.2.1.2. Estructura de la llama.

Las regiones más importantes de la llama (ver figura 8 y 9 en anexos) son la **zona de combustión primaria**, la **región interconal** y la **zona de combustión secundaria**. El aspecto y el tamaño relativo de estas regiones varían considerablemente con la relación combustible-oxidante, así como con el tipo de combustible y de oxidante. La zona de combustión primaria se reconoce por su coloración azul que proviene de los espectros de bandas y otros radicales. En general, en esta zona no se alcanza el equilibrio térmico y, por ello, esta zona rara vez se utiliza en la espectroscopia de llama. La región interconal, puede alcanzar varios centímetros de altura con fuentes ricas en combustible de acetileno/oxígeno o acetileno/óxido nitroso. La zona es frecuentemente rica en átomos libres y es la parte de la llama más ampliamente utilizada en espectroscopia. En la zona de combustión secundaria, los productos formados en la región interior se convierten en óxidos moleculares estables que se dispersan por los alrededores.

El perfil de la llama proporciona información útil respecto a los procesos que tienen lugar en las distintas partes de la llama; es una representación de contornos que muestra las



regiones de la llama donde una variable de interés tiene valores similares. Algunas de estas variables son la temperatura, la composición química, la absorbancia y la intensidad radiante o fluorescente.

6.2.1.3. Atomizadores de llama.

Los atomizadores de llama se emplean en espectroscopía de emisión, absorción y fluorescencia atómica. El diagrama de un típico mechero de flujo laminar de fabricación comercial emplea un nebulizador de tubo concéntrico. El aerosol, formado por el flujo del gas oxidante, se mezcla con el combustible y pasa a través de una serie de deflectores que eliminan las gotitas de disolución que no sean muy finas. Como consecuencia de la acción de estos deflectores, la mayor parte de la muestra se recoge en el fondo de la cámara de mezcla, donde se drena hacia un contenedor de desechos. El aerosol, el oxidante y el combustible se queman pues en un mechero provisto de una ranura, que produce una llama que generalmente mide entre 5 y 10 cm de longitud.

Los mecheros de flujo laminar (ver figura 10 en anexos) proporcionan una llama relativamente estable y larga. Estas propiedades tienden a aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad. La cámara de mezcla en este tipo de mechero contiene una mezcla potencialmente explosiva, que se puede prender por el retroceso de la llama, si su caudal es demasiado bajo. Por esta razón, el mechero de flujo laminar está equipado con unas válvulas para disminuir la presión.

6.2.1.4. Reguladores de combustible y oxidante.

En la espectroscopía de llama, los caudales de oxidante y de combustible constituyen variables importantes que requieren un control preciso. Los caudales se controlan, por lo general, por medio de reguladores de presión de doble diafragma seguidos de válvulas de aguja situadas en el instrumento. El sistema de medida de caudal más empleado es el rotámetro, que consiste en un tubo cónico, graduado y transparente montado verticalmente con su extremo más estrecho hacia abajo. El flujo de gas levanta un flotador liviano, cónico o esférico, cuya posición vertical está determinada por el caudal de gas.

6.2.2. Atomización electrotérmica.

Proporciona generalmente una mayor sensibilidad debido a que toda la muestra se atomiza en un período muy corto y el tiempo promedio de permanencia de los átomos en el camino óptico es de un segundo o más. Los atomizadores electrotérmicos se utilizan para las medidas de absorción atómica y de fluorescencia atómica, pero, por lo general, no se han aplicado para la obtención directa de espectros de emisión. Sin embargo, se están



empezando a utilizar para vaporizar las muestras para la introducción de las mismas en espectroscopía de emisión en plasma de acoplamiento inductivo.

En los atomizadores electrotérmicos, unos pocos microlitros de muestra se evaporan primero a baja temperatura y, luego, se calcinan a una temperatura algo más alta en un tubo de grafito, o cubeta de grafito calentado eléctricamente. Tras la calcinación, la corriente se incrementa rápidamente a varios cientos de amperios, lo que eleva la temperatura a unos 2.000 o 3.000 °C; la atomización de la muestra se produce en un período de tiempo de unos pocos milisegundos a segundos. En estas condiciones, se mide la absorción o la fluorescencia de las partículas atomizadas en la zona situada inmediatamente por encima de la superficie calentada.

6.2.2.1. Atomizadores electrotérmicos.

En este sistema, la atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito (ver figura 11 en anexos) abierto por ambos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra mediante una micropipeta. El tubo es de unos 5 cm de largo y tiene un diámetro interno de algo menos de 1 cm. El tubo intercambiable de grafito se ajusta perfectamente a un par de contactos eléctricos de grafito cilíndricos que se ubican en los dos extremos del tubo. Estos contactos se mantienen dentro de una caja metálica refrigerada por agua. Existen dos corrientes de gas inerte. La corriente externa previene la entrada de aire exterior y la consiguiente incineración del tubo. La corriente interna fluye por entre los dos extremos del tubo y sale por el orificio central del compartimento de muestra. Esta corriente no sólo elimina el aire sino que sirve también para desalojar los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento. La **plataforma de L'vov** también es de grafito y se encuentra debajo del orificio de entrada de la muestra. La muestra se evapora y se calcina sobre esta plataforma de la manera usual.

6.2.3. Atomización por descarga luminiscente.

Un dispositivo de descarga luminiscente produce un vapor atómico que puede llevarse a una celda (ver figura 12 en anexos) para realizar medidas de absorción. Consiste en una celda cilíndrica de unos 17 cm de longitud, con un orificio circular de unos 2 cm de diámetro cortado cerca de la mitad del cilindro. Una arandela rodea el orificio. La muestra se presiona contra este orificio con un tornillo para sellar el tubo. De unos diminutos inyectores, dispuestos en círculo sobre la muestra, salen seis finas corrientes de argón que inciden de forma hexagonal sobre la superficie de la muestra. El argón se ioniza por la corriente entre un ánodo, que mantiene los inyectores, y la muestra, que actúa como cátodo. Como consecuencia del chisporroteo, se forman rápidamente seis cráteres en la superficie



de la muestra. Los átomos proyectados son succionados por el vacío hacia el eje de la celda, donde absorben la radiación procedente de la fuente del espectrómetro.

Para que esta técnica sea aplicable, la muestra debe ser un conductor eléctrico o puede mezclarse con un conductor en polvo, como grafito o cobre finamente molido (pellet). Las muestras en disolución también pueden analizarse por deposición sobre un cátodo de grafito, aluminio o cobre.

6.2.4. Atomización en vapor frío.

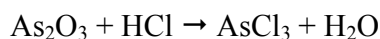
La técnica de vapor frío es un método de atomización aplicable solamente a la determinación de mercurio, ya que es el único elemento metálico que tiene una presión de vapor apreciable a temperatura ambiente. El método de elección para su análisis es la vaporización fría seguida de espectrofotometría de absorción atómica. En la realización de este tipo de análisis, el mercurio se convierte en Hg^{2+} por tratamiento de las muestras con una mezcla oxidante de ácido nítrico y sulfúrico seguido de reducción del Hg^{2+} al metal con SnCl_2 . El mercurio elemental es conducido entonces a un tubo de absorción de camino óptico largo burbujeando una corriente de gas inerte a través de la mezcla a partir de la cual se formó el elemento. El análisis se completa midiendo la absorbancia a 253,7 nm.

6.2.5. Generación de Hidruros.

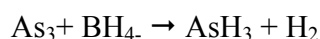
La generación de hidruros (ver figura 13 en anexos) es aplicable a elementos que forman fácilmente hidruros volátiles (As, Se, Sb, Te, Bi y Sn) y absorben a longitudes de onda próximas a 200 nm donde la absorción de los gases de la llama es elevada.

Las etapas para atomizar una muestra con el generador de hidruros son:

1. Disolución de la muestra en HCl para tener los elementos en forma iónica.



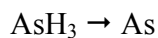
2. Formación del hidruro mediante reacción con borohidruro de sodio NaBH_4 .



3. Transporte del hidruro mediante un gas inerte a la celda de medida, normalmente de cuarzo.



4. Atomización mediante llama o calentamiento electrotérmico.



Los límites de detección que se alcanzan con esta técnica son mucho más bajos que los obtenidos con la llama, ya que la cantidad de muestra que se atomiza es mucho mayor.

6.3. Selectores de longitudes de onda.

Los espectrofotómetros suelen estar provistos de uno o varios dispositivos para que la radiación medida quede restringida a una estrecha banda absorbida o emitida por el analito. Esos dispositivos refuerzan tanto la selectividad como la sensibilidad de un instrumento. Además en el caso de las medidas de absorción las bandas de radiación estrechas reducen en alto grado la posibilidad de desviación de la ley de Beer debida a la radiación policromática. Muchos instrumentos utilizan un **monocromador** (ver figura 14 en anexos) para aislar la banda de longitud de onda deseada para que sólo la banda objeto de interés sea detectada y medida.

El monocromador es un dispositivo que contiene una rendija de entrada y una rendija de salida. Esta última se utiliza para aislar una pequeña banda de longitudes de onda. Las bandas se aíslan una por una y se pueden transmitir de forma secuencial haciendo girar la rejilla. Cuando se hace girar la rejilla se logra que diferentes longitudes de onda pasen a través de la rendija de salida. Así, la longitud de onda de salida de un monocromador puede variar de manera continua en un gran intervalo del espectro. El intervalo de longitudes de onda que pasan por un monocromador, denominadas paso de banda espectral o ancho de banda efectiva, puede ser menor que 1 nm en los instrumentos más caros o mayor de 20 nm en los sistemas baratos. Debido a la facilidad con que se pueden modificar la longitud de onda en un instrumento basado en un monocromador, estos sistemas *se* utilizan frecuentemente tanto en aplicaciones de bando espectral como en otras en las que se requiere una longitud de onda fija. El ancho de banda efectiva de un selector de longitud de onda es la anchura de la banda de radiación en unidades de longitud de onda a la mitad de la altura de un máximo.

6.3.1. Componentes de los monocromadores.

Los elementos ópticos (ver figura 15 en anexos) que hay en todos los monocromadores, son: (1) una rendija de entrada que proporciona una imagen óptica rectangular; (2) una lente colimadora o un espejo que produce un haz paralelo de radiación; (3) un prisma o una red que dispersa la radiación en sus longitudes de onda individuales; (4) un elemento focalizador que forma de nuevo la imagen de la rendija de entrada y la enfoca en una superficie plana denominada plano focal y (5) una rendija de salida en el plano focal que



aísla la banda espectral deseada. Además, la mayoría de los monocromadores tienen ventanas de entrada y de salida, que se diseñan para proteger a los componentes del polvo y de los vapores corrosivos del laboratorio. En los monocromadores hay dos clases de elementos dispersantes: redes de reflexión y prismas.

6.4. Detección y Medida de la energía radiante.

Para obtener información espectroscópica, la energía radiante transmitida manifestada tiene que ser detectada de alguna manera y convertida en una cantidad cuantificable. Un detector es un dispositivo que indica la existencia de algún fenómeno físico. La información buscada se codifica invariablemente y se procesa como una señal eléctrica.

Un **transductor** es un tipo de detector que convierte distintos tipos de cantidades químicas y físicas en señales eléctricas, tales como intensidad luminosa, pH, masa y temperatura, en señales eléctricas que después pueden ser amplificadas, manipuladas y convertidas finalmente en números proporcionales a la magnitud de la cantidad original.

6.4.1 Propiedades de los transductores de radiación.

El transductor ideal para radiación electromagnética responde rápidamente a niveles bajos de energía radiante en una amplia gama de longitudes de onda. Además, produce una señal eléctrica que es fácilmente amplificable y tiene bajo nivel de ruido eléctrico. Debe tener un tiempo de respuesta rápido y una señal de salida igual a cero en ausencia de iluminación.

Muchos detectores reales muestran, en ausencia de radiación, una respuesta pequeña y constante conocida como corriente oscura. La **corriente oscura** es la corriente producida por un detector fotoeléctrico cuando ninguna luz incide en él.

6.4.2. Tipos de detectores de radiación.

Existen dos tipos generales de detectores de radiación, uno responde a los fotones y el otro al calor. La mayoría de los instrumentos de absorción atómica utilizan detectores de fotones (tubos fotomultiplicadores).

Todos los detectores de fotones (también denominados detectores fotoeléctricos o cuánticos) tienen una superficie activa, que es capaz de absorber radiación. En algunos tipos, la energía absorbida causa la emisión de electrones y el desarrollo de una fotocorriente. En otros, la radiación promueve electrones a las bandas de conducción; en este caso, la detección se basa en el aumento de la conductividad resultante (fotoconducción).



6.4.2.1. Fototubos y Tubos Fotomultiplicadores.

La respuesta de un fototubo o un tubo fotomultiplicador (ver figura 16 en anexos) se basa con el efecto fotoeléctrico. Un fototubo consiste en un fotocátodo semicilíndrico y un ánodo de alambre sellado dentro de una cubierta al vacío de cristal o cuarzo transparente. En la superficie cóncava del cátodo hay una capa de material fotoemisivo, como un metal alcalino o un óxido metálico que emite electrones cuando es irradiado con luz provista de la energía apropiada. Cuando se aplica voltaje a través de los electrodos los fotoelectrones emitidos son atraídos por el ánodo de alambre cargado positivamente. El resultado es una fotocorriente que es fácil de amplificar y medir. El número de fotoelectrones expulsados del fotocátodo por unidad de tiempo es directamente proporcional a la energía radiante del rayo que incide en la superficie. Cuando se aplica un voltaje de 90V o más, todos esos fotoelectrones son recolectados en el ánodo para proveer una fotocorriente que también es proporcional a la energía radiante del rayo.

El tubo fotomultiplicador (PMT) es similar en su construcción al fototubo. Pero su sensibilidad es significativamente mayor. Su fotocátodo es similar al del fototubo, ya que emite electrones cuando se expone a la radiación. Sin embargo, en lugar de un solo ánodo de alambre, el PMT tiene una serie de electrodos llamados dínodos. Los electrones emitidos por el cátodo son acelerados hacia el primer dínodo, el cual se mantiene a un potencial positivo entre 90 y 100 V con respecto al cátodo. Cada fotoelectrón acelerado que choca con la superficie del dínodo produce varios electrones, llamados electrones secundarios que a su vez son acelerados hacia el dínodo 2, que se mantiene entre 90 y 100V más positivo que el dínodo 1. Una vez más, el resultado es una amplificación electrónica. Cuando este proceso se ha repetido en cada uno de los dínodos se han producido entre 10^5 y 10^7 electrones por cada fotón incidente. Esta cascada de electrones se recoge finalmente en el dínodo para proveer una corriente media que es aún más amplificada electrónicamente y medida.

6.5. Procesadores de Señal y Dispositivos de Lectura.

El procesador de señal es generalmente un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica del detector. Además, puede cambiar la señal de corriente continua a corriente alterna (o a la inversa), cambiar la fase de la señal y filtrarla para eliminar los componentes no deseados. Además, el procesador de señal puede utilizarse para llevar a cabo operaciones matemáticas en la señal como diferenciar, integrar o convertir a logaritmo. Existen distintos tipos de dispositivos de lectura en los instrumentos modernos. Algunos de ellos son el medidor d'Arsonval, medidores digitales, escalas de potenciómetros, registradores y tubos de rayos catódicos.



6.5.1. Recuento de fotones.

La señal de salida de un tubo fotomultiplicador provoca un impulso de electrones por cada fotón que alcanza la superficie del detector. En general, esta señal analógica se filtra para eliminar las fluctuaciones indeseables, debido a la aparición aleatoria de fotones en el fotocátodo y que son medidos como corriente o tensión de corriente continua. Sin embargo, si la intensidad de la radiación es demasiado baja para proporcionar una relación señal/ruido satisfactoria, es posible, y con frecuencia ventajoso, convertir la señal analógica en un tren de impulsos digitales que se puedan contar.

El recuento de fotones presenta una serie de ventajas respecto al tratamiento analógico de la señal, tales como mejora de la relación señal/ruido, sensibilidad a niveles bajos de radiación, mejora de la precisión para un tiempo dado de medida y menor sensibilidad a las fluctuaciones de tensión y temperatura del tubo fotomultiplicador.

7. INTERFERENCIAS EN ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN.

Muchos de los efectos de interferencia por contaminantes son similares en emisión atómica de llama y de plasma. Sin embargo, algunas técnicas pueden ser más propensas a ciertas interferencias y estar libres de átomos.

Los efectos de interferencia se dividen de manera práctica en interferencias de blanco o añadidas e interferencias de analito o multiplicativas.

7.1. Interferencias del blanco.

Una interferencia de blanco o añadida produce un efecto que es independiente de la concentración del analito. Tal efecto se reduciría o eliminaría si fuera posible preparar y analizar un blanco perfecto en las mismas condiciones. Un ejemplo de esto son las interferencias espectrales. En la espectroscopía de emisión cualquier elemento que no sea el analito y emita radiación en el paso de banda del dispositivo selección de longitud de onda o que cause la aparición de luz parásita en el paso de banda provoca una interferencia de blanco.

La emisión de banda molecular también puede causar una interferencia de blanco. Es especialmente problemática con la espectrometría de flama, donde la temperatura más baja y la atmósfera reactiva tienen mayores probabilidades de producir especies moleculares. Es habitual que mejorar la resolución del espectrómetro no reduzca la banda de emisión, ya que las líneas estrechas del analito se sobrepone con la amplia banda de emisión



molecular. La radiación de fondo del plasma o llama se compensa ligeramente de manera satisfactoria con medidas de solución blanco.

7.2. Interferencias del Analito.

Las interferencias del analito cambian la magnitud de la señal del analito mismo. Generalmente no son espectrales, sino físicas y/o químicas.

Las **interferencias físicas** pueden modificar los procesos de aspiración, nebulización, desolvatación y volatización. Así, las sustancias de la muestra que cambian la viscosidad de la disolución pueden alterar la velocidad de flujo y la eficacia del proceso de nebulización. Los componentes combustibles, como los disolventes orgánicos modifican la temperatura del atomizador y, como consecuencia, afectan indirectamente a la eficacia de la atomización.

Las **interferencias químicas** normalmente son específicas de ciertos analitos. Ocurren en la conversión de la partícula sólida o fundida después de la desolvatación en átomos libres o iones elementales.

Los componentes que influyen en la volatización de las partículas del analito causan este tipo de interferencia y frecuentemente se llaman **interferencias de volatización** del soluto.

Estos efectos a veces se pueden eliminar o minimizar utilizando temperaturas más altas. Alternativamente, pueden emplearse **agentes de liberación**, que son especies que reaccionan de manera preferente con el interferente y previenen su interacción con el analito.

Los **agentes protectores** previenen la interferencia al formar de manera preferente especies estables, a la vez que volátiles, con el analito. Tres reactivos muy empleados con este propósito son el EDTA, 8-hidroxiquinoleína y APDC (sal de amoníaco del ácido 1-pirrolidina-carboditioico). Por ejemplo, se ha comprobado que la presencia de EDTA minimiza o elimina las interferencias del silicato, fosfato y sulfato en la determinación del calcio.

Las sustancias que modifican la ionización del analito también causan **interferencias de ionización**. La presencia de un elemento de fácil ionización, como el K puede modificar el grado de ionización de elementos que no se ionizan tan fácilmente, como el Ca. En llamas, es posible que ocurran efectos relativamente cuantiosos, a menos que se añada intencionadamente un elemento de fácil ionización a la muestra en cantidades relativamente grandes. Estos supresores de ionización contienen elementos como el K, Na, Li, Cs ó Rh.



Cuando se ionizan en la llama, esos elementos producen electrones, que desvían el equilibrio de ionización del analito a favor de átomos neutros.

Absorción de fondo: debida a la presencia de moléculas en la muestra que no se disocian y dan lugar a bandas de absorción, que se superponen a la longitud de onda del analito. Se eliminan con una fuente continua de radiación incorporada al instrumento (lámpara de deuterio en la zona ultravioleta o de ioduro de wolframio en la zona visible).



II. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. GENERALIDADES.

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo:

- a) Especificar e implementar.
- b) Aprobar.
- c) Documentar.

1.1 Definición analítica: Validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

De acuerdo con la Norma UNE EN ISO 9000:2000 (UNE 2000a), desde un punto de vista general, la validación puede definirse como “la confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista”. De todas ellas se ha adoptado, con pequeñas modificaciones, la incluida en el documento The Fitness for Purpose of Analytical Methods (EURACHEM, 1998), según el cual la validación es “un proceso, basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar”.

El concepto de validación incluye dos aspectos fundamentales: por una parte, la evaluación de los parámetros de calidad del método (algunas veces denominada validación intrínseca) y, por la otra, la adecuación de los mismos a unos requerimientos analíticos concretos, enfocados a la resolución de un problema (validación extrínseca).

1.2. Razones que justifican la Validación de Métodos Analíticos.

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.



- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico si no también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

Al llevar a cabo la validación de un método analítico es preciso tener en cuenta tres aspectos básicos que, por su importancia, Massart (1997) denomina **las reglas de oro de la validación**:

- Validar el proceso analítico en su conjunto, incluyendo las etapas de tratamiento de la muestra previas a la medida analítica (disolución, extracción, preconcentración, *clean-up*). Generalmente, estas etapas exigen una manipulación importante de las muestras y por ello suelen afectar a la exactitud, la precisión y la robustez del método de manera más significativa que la medida final.
- Validar el método en todo el intervalo de concentraciones en que se va aplicar. Ello exige que, como mínimo se evalúen, los parámetros de calidad a dos niveles, uno alto y otro bajo, de concentración. Es bien conocido que, por ejemplo, la precisión depende de la concentración. Así mismo, en aquellos métodos que incluyen una etapa de extracción, la recuperación y, en consecuencia, la exactitud, pueden depender también del nivel de concentración.
- Validar el método en cada una de las matrices a las que se va aplicar. Así, un método validado para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas superficiales puede no ser directamente aplicable a agua de mar o a agua residuales.

Para iniciar la Validación es necesario previamente:

- Tener perfectamente caracterizado el analito.
- Trabajar con una formulación definitiva (en caso de especialidad), puesto que cambios en la composición incluso a nivel de excipientes afectarán probablemente al procedimiento analítico.



- Trabajar suficientemente con el método de análisis como para que nuestro conocimiento acerca de éste, nos ofrezca garantías de que la validación puede ser satisfactoria. Sólo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación. Por ello en el desarrollo previo del método, es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez para garantizar la bondad del procedimiento que se quiere validar.

1.3. Métodos a ser susceptibles a ser validados.

Son validables los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación.
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (Ej. Test de disolución).
- Ensayos de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas.
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos.

1.4. Documentación de la Validación.

Toda validación comienza a partir de un método ya probado y ajustado. La validación trata de demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados adecuados a las exigencias. Dicha demostración debe ser siempre documentada de acuerdo al siguiente esquema:





2. PARÁMETROS A EVALUAR PARA VALIDAR UN MÉTODO.

El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerá básicamente del tipo de ensayo, pudiendo resumirse en la siguiente tabla recomendada en la guía ICH Q2A:

Parámetros	Identificación	Prueba de Impurezas		Valoración: -Disolución ⁽⁵⁾ -Contenido
		Cuantitativo	Test Límite ⁽⁴⁾	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión Intermedia	-	+ ⁽¹⁾	-	+ ⁽¹⁾
Selectividad ⁽²⁾	+	+	+	-
Límite de Detección	-	- ⁽³⁾	+	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	+
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	- ⁽⁴⁾	+

Notas:

- (1) En los casos en los que se realiza la reproducibilidad no es necesario realizar la precisión intermedia.
- (2) La falta de selectividad de un procedimiento analítico puede ser compensada por otros procedimientos.
- (3) Puede ser necesario en algunos casos.
- (4) Puede ser requerido según el método de acuerdo a USP 24.
- (5) USP 24 sólo considera el estudio de la precisión en los ensayos de comprobación de características (test de disolución). Los otros parámetros pueden ser requeridos.

3. LINEALIDAD Y RANGO.

3.1. Definición.

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpelación e interpretación.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones.



3.2. **Ámbito de aplicación:**

Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo.⁽¹⁾

- Valoración del contenido de principio activo.
- Uniformidad de contenido.
- Velocidad de disolución.
- Cuantificación de impurezas.

3.3. **Procedimientos de determinación de la linealidad.**

3.3.1. **Consideraciones generales.**

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomienda; estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado ($K= 5$, nº de réplicas= 3) con un total de 15 determinaciones ($n=15$). Por ejemplo; 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico. Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes (por ejemplo 15 pesadas), ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones. No obstante, para evaluar la linealidad en las impurezas se suelen utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja a niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas.
- Las muestras a analizar pueden prepararse a partir de estándares de analito de concentración conocida, o bien a partir de un lote de concentración conocida de la especialidad terminada. De esta última forma el estudio de linealidad puede servir también para evaluar la recuperación y con ella la exactitud del método.
- El número de repeticiones de cada muestra (por ejemplo el número de inyecciones en HPLC) dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento analítico a validar.



Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente o predictiva) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = a + bx$, obtenida por un método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). En algunos casos podría ser necesaria alguna transformación matemática previa (uso de logaritmos, recíprocos de las variables, etc.) para obtener funciones lineales.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste. Se pueden representar además las hipérbolas indicativas de los intervalos de confianza.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas).

3.3.2. Evaluación estadística de la linealidad.

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Para realizar esta evaluación las fórmulas que se pueden aplicar son las siguientes:

Ecuación de la Recta	$y = b * x + a$	(Ec. 4)
Valor estimado para x	$\hat{y}_i = b * x_i + a$	
Valor residual	$e_i = \hat{y}_i - y_i$ i grupos	

3.3.2.1. Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen.

En la recta de regresión $y=b*x+a$, x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y, a el término independiente.

La pendiente b se encuentra relacionada con la Sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El término independiente a , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.



3.3.2.2. Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2).

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación, con una, probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 , aunque en el caso de impurezas se admite ≥ 0.990 . La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo r^2 coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo.

3.3.2.3. Variancia residual constante (homoscedasticidad).

La representación de los residuales e_1 , aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.

3.3.2.4. Análisis de la Variancia: ANOVA.

Para poder realizar una ANOVA se deben cumplir los siguientes supuestos:

- a) Homogeneidad de variancias.
- b) Normalidad de los residuales.

a) Homogeneidad de variancias:

La homogeneidad de variancias se puede comprobar aplicando, por ejemplo, un test de Cochran que indicará si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Estadísticamente sería más correcto normalizar previamente las respuestas, ya que de lo contrario se comparan coeficientes de variación que corresponden a medias de concentración diferentes entre sí. De todas formas es habitual efectuar el test sin cumplir este requisito cuando el intervalo de concentraciones no es excesivamente amplio.

El valor de G_{exp} se calcula de la siguiente forma:

$$G_{exp} = \sum^{S^2 \text{ máxima}} S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2 \quad (\text{Ec. 5})$$



Donde

- s_i^2 = variancia de cada grupo K.
- $s^2_{\text{máxima}}$ = variancia máxima de los K grupos.
- $G_{\text{tablas}} (\alpha=0.05, K=5, n=3) = 0.68$

Las variancias no deben ser estadísticamente diferentes entre sí para el grado de significación escogido, generalmente $\alpha = 0.05$.

En caso de que la homogeneidad de variancias no se cumpla, caben dos posibilidades:

- Si se debe a la mayor variabilidad del uno de los extremos del rango, éste se puede acortar siempre y cuando los márgenes de especificaciones lo permitan.
- Puede plantearse el análisis a otro nivel de concentraciones que favorezca una menor variabilidad.

b) Normalidad de los residuales:

La normalidad de los residuales se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadísticos realizan' de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobados estos supuestos, se calcularán los estadísticos F_1 y F_2 tal y como se indicó del ANOVA.

$F_{1\text{exp}} > F_{2\text{tablas}}$ demuestra la existencia de una pendiente distinta de 0.

$F_{1\text{exp}} < F_{2\text{tablas}}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Los valores tabulados para F se obtienen de las tablas estadísticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación a normalmente igual a 0.

3.3.2.5. Test de linealidad.

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

a) Coeficientes de variación de los factores de respuesta (f).

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de



calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Valores del coeficiente de variación superiores al 5% serían indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables valores no superiores al 2%.

$$\bar{f} = \frac{\sum y_i}{\sum x_i} \quad (\text{Ec. 6})$$

Procedimiento a seguir:

- Corregir respuestas (y , - a).
- Calcular f para cada concentración.
- Determinar \bar{f} (promedio de los factores respuesta) y S_f (desviación estándar de los factores respuesta).⁽¹⁾
- Calcular el coeficiente de variación CV(%).

$$CV = \frac{S_f}{\bar{f}} * 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

- S_f = desviación estándar de los factores de respuesta.
- \bar{f} = valor medio de los factores de respuesta.

b) Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba t de Student.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{s_b} \quad (\text{Ec. 8}) \quad s_b \text{ se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual } S^2_{yx}$$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación a igual a 0.05.

También es habitual calcular los intervalos de confianza a partir de la expresión: $b \pm t * s_b$, siendo en este caso t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación a igual a 0.05. Estos intervalos de confianza no deberían incluir el cero.

3.3.2.6. Test de proporcionalidad.



El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero.

Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1 % de la respuesta del analito a valor nominal.

Para llevar a cabo este test se recurre como en el caso anterior a una prueba de significación t de Student (n-2 grados de libertad, $\alpha=0.05$):

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a} \quad (\text{Ec. 9}) \quad s_a \text{ se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual } s_{yx}^2$$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido. En los intervalos de confianza ($a \pm t \cdot s_a$) debe estar incluido el cero.

En caso de no cumplirse el test de proporcionalidad sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre al menos dos estándares uno superior y otro inferior. De esta forma se obvia el sesgo del método.

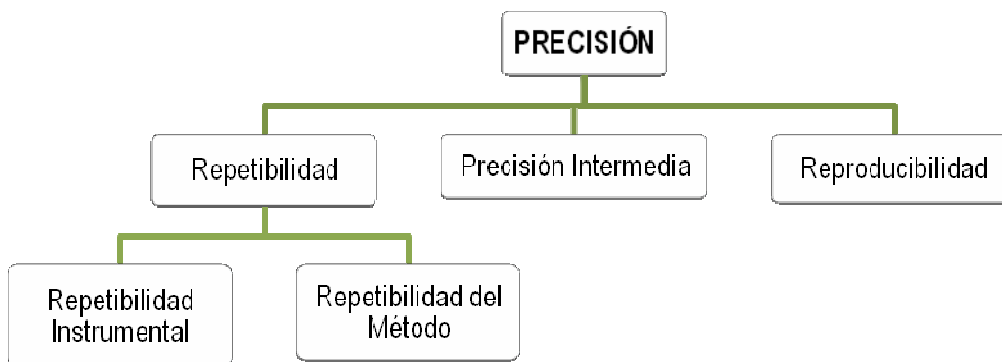
4. PRECISIÓN.

4.1. Definición.

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

La precisión engloba diferentes tipos de estudios:



La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

- S= desviación estándar.
- \bar{x} = media aritmética de los resultados.

4.2. **Ámbito de aplicación.**

Según la ICH Q2B el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas. Por lo tanto la evaluación de la precisión no es necesaria ni en el ensayo de identificación ni en el test límite de impurezas.

4.3. **Repetibilidad.**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La Repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas. Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Así por ejemplo, cuando se trabaja a concentraciones altas (materia prima) se aceptan valores de coeficientes de variación más bajos que cuando se trabaja a concentraciones más bajas



(por ejemplo impurezas). Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis. El número de replicados se deduce a partir del coeficiente de variación de repetibilidad del método.

4.3.1. Repetibilidad del sistema instrumental.

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces. En el caso que se desee analizar el principio activo de una materia prima o de una especialidad farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal, y en el caso de analizar impurezas a la concentración del límite especificado.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas conocidas. Para especialidades farmacéuticas y materia prima suelen aceptarse valores inferiores al 1-2%. Mientras que para el análisis de impurezas los valores aceptados se sitúan alrededor del 5%. En la siguiente tabla se dan valores orientativos de coeficientes de variación para la repetibilidad instrumental en función del rango de aceptación y del número de replicados a efectuar en el método de análisis.

Valores orientativos del coeficiente de variación para la repetibilidad del método y repetibilidad del sistema instrumental.

Intervalo de aceptación (%)	Análisis único (n=1)		Análisis duplicado (n=2)	
	CV (%) del método	CV (%) instrumental	CV (%) del método	CV (%) instrumental
98.5-101.5	0.58	0.41	0.82	0.58
97.0-103.0	1.16	0.82	1.64	1.16
95.0-105.0	1.94	1.37	2.74	1.94
90.0-110.0	3.88	2.74	5.48	3.88
85.0-115.0	5.81	4.11	8.22	5.81
75.0-125.0	9.69	6.85	13.70	9.69
50.0-150.0	19.38	13.70	27.41	19.38

4.3.2. Repetibilidad del método.

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.



Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.

a) Coeficiente de variación.

El cálculo del coeficiente de variación permite deducir el número de replicados que se deben realizar en el método de ensayo para un determinado intervalo de aceptación. Esta relación se establece según la fórmula siguiente (aplicable a principios activos):

$$CV = |100 - LA| * \frac{\sqrt{n}}{Z} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

- LA = valor límite aceptado.
- n= número de replicados que se deben realizar en el método de análisis.
- Z (a= 0.01)= 2.58.

En la siguiente tabla se relaciona el coeficiente de variación con el número de replicados aplicando la ecuación anterior. Por ejemplo si al determinar la repetibilidad del método se obtiene un coeficiente de variación de 0.50% para un intervalo de aceptación del 99.0-101.0% el número de análisis recomendable será de dos.

Valores orientativos del número de replicas en función de la repetibilidad del método.

Intervalo de aceptación (%)	CV (%) máximo aceptable				
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
99.0-101.0	0.39	0.55	0.67	0.78	0.87
98.5-101.5	0.58	0.82	1.01	1.16	1.30
98.0-102.0	0.78	1.10	1.34	1.55	1.73
95.0-105.0	2.94	2.74	3.36	3.88	4.33
90.0-110.0	3.88	5.48	6.71	7.75	8.67
85.0-115.0	5.81	8.22	10.07	11.63	13.00



Los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el coeficiente de variación del método. La expresión matemática que permite relacionar ambos coeficientes de variación es:

$$CV_{\text{método}} = CV_{\text{sistema}} * \sqrt{2} \quad (\text{Ec. 12})$$

A partir de esta expresión se pueden deducir los valores de la tabla anterior para el coeficiente de variación instrumental.

b) Intervalos de confianza.

La guía ICH Q2B⁽¹¹⁾ recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiado. Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

- Los resultados individuales $\bar{x} \pm t * s$ (Ec. 13)

- Los resultados promedios $\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$ (Ec. 14)

Donde:

- \bar{x} = media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.
- t = valor de la t de Student de tablas para $n-1$ grados de libertad y $\alpha = 0.05$.
- n = número de análisis.
- S = desviación estándar.

4.4. Precisión intermedia.

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el



analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

Para estudiar los, factores de una manera aleatoria se recomienda un estudio matricial y, para cada combinación de éstos, las muestras deben ser preparadas independientemente como mínimo por triplicado.

A continuación se propone un modelo de un diseño experimental donde se estudia la variación de los factores; día de análisis, analista e instrumento. En este modelo se presenta el caso particular de determinar la variación de los resultados obtenidos al considerar dos analistas, dos instrumentos y realizando el análisis tres días diferentes.

Instrumento A	Analista X	Día 1	Día 2	Día 3
	Analista Y	Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento B	Analista X	Día 1	Día 2	Día 3
	Analista Y	Día 1	Día 2	Día 3

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente.

Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cual es el factor responsable de esta variabilidad. Se recomienda, además, determinar el coeficiente de variación para cada grupo de análisis para comprobar que se cumplen las especificaciones establecidas en la repetibilidad del método.

4.5. Reproducibilidad.

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La reproducibilidad estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios.

La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método.



Estas condiciones operativas y ambientales diferentes (Huber, 1999) pueden ser:

- Humedad y temperatura ambiental diferente.
- Analistas con diferente experiencia.
- Instrumentos de características diferentes (volumen muerto en un HPLC).
- Variaciones de condiciones instrumentales (composición de la fase móvil, pH y flujo).
- Variaciones de detalles experimentales no especificadas en el método.
- Equipos y fungibles de diferente antigüedad.
- Columnas cromatográficas de distintos lotes y/o proveedores.
- Disolventes y reactivos de diferente calidad.

Este estudio es necesario si se pretende realizar el método en diferentes laboratorios o si se quiere estandarizar un procedimiento analítico, por ejemplo para incluirlo en las Farmacopeas.

5. EXACTITUD.

5.1. Definición.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿Cuál es el valor verdadero del analito en la muestra?. Por desgracia el valor verdadero en muchos casos se desconoce. No obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede, evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón. También se acepta la comparación de los resultados con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.



- 1) Principio activo (analito puro).
- 2) Placebo cargado con el analito.
- 3) Muestra problema cargada con el analito.

5.2. **Ámbito de aplicación.**

Según la guía ICH, Q2A⁽¹⁰⁾ debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima y en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas. Según la USP 24 también debe evaluarse la exactitud en los métodos de análisis de estudios de velocidad de disolución.

5.3. **Procedimientos de determinación de la exactitud.**

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo 3 determinaciones x 3 niveles de concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

- 1) Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80-120%.
- 2) Impurezas: desde el 50% del nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel.
- 3) Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de Q-20% a Q+20%; si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada periodo de tiempo se aplicaría ($\pm 20\%$).



La exactitud se expresara como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

Expresión matemática de la Exactitud:

$$\text{Porcentaje de Recuperación } (R) = \frac{x_m}{\mu} * 100 \quad (\text{Ec. 15})$$

$$\text{Diferencia} = x_m - \mu$$

Donde: x_m : Valor medio hallado.

μ : Valor aceptado como verdadero.

5.4. Comparación con un método de referencia validado.

Se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia cuya exactitud este bien determinada o definida.

Esta estrategia se basa en la aplicación de ambos métodos a los materiales que habitualmente analiza el laboratorio y la comparación de los resultados obtenidos mediante la aplicación del test de Student o mediante el análisis de regresión. Para evitar que algún efecto sistemático pueda afectar de forma parecida a los resultados obtenidos por ambos métodos, a ser posible los métodos aplicados serán independientes y para ello se basarán en técnicas distintas tanto en el tratamiento de la muestra como en la determinación.

5.5. Aplicación del método analítico a una muestra de concentración conocida.

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo que no contenga el analito en cuestión, se puede usar el método de adición de patrón sobre el problema.

a) Método del placebo cargado: Se prepara un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar. Sobre dicho placebo se añaden cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. El ensayo de recuperación se realiza como mínimo con 3 replicados para cada nivel. El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación. El problema del método del placebo cargado está en cómo se introduce el analito sobre el placebo. El proceso de adición, por mucho que simule lo más exactamente posible la preparación del producto acabado, sólo se trata de una aproximación ya que en el producto acabado real el analito o principio activo está íntimamente mezclado con los otros ingredientes. Por lo tanto, la eficacia de la recuperación obtenida con el método del placebo cargado puede llegar a ser más elevada de lo que en realidad es. Aún



teniendo en cuenta este inconveniente, el método del placebo cargado es una técnica común y aceptada para la determinación de la recuperación y la exactitud de un método.

b) Método de adición de patrón: Se utiliza esta aproximación cuando no es posible preparar un placebo de la matriz de la muestra que no contenga el analito. Este podría ser el caso de las muestras liofilizadas en los que la presencia o ausencia del analito es significativamente distinta. Se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. Se realizan como mínimo 3 replicados para cada nivel y se analizan las muestras adicionadas y no adicionadas según el método analítico calculando finalmente la recuperación. Este método tiene la ventaja de utilizar muestras reales y no requiere la preparación especial de un placebo cargado. No obstante, también debe hacerse la misma reflexión que para el método del placebo cargado, ya que la adición de un patrón sobre una muestra no es exactamente lo mismo que el producto acabado real.

6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

6.1. Definición.

Dado un método analítico determinado, se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección (LD) la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (ICH Q2A).

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es sólo cualitativo, encontrándose entre ambos términos un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos. No deben confundirse estos términos con otro al que normalmente se asocian, la Sensibilidad, ya que, ésta es la capacidad de un método de análisis para discriminar pequeñas diferencias en concentración o masa del analito. Por lo tanto en términos prácticos, la sensibilidad es la pendiente de la curva de calibración obtenida al representar la respuesta frente a la concentración (Huber, 1999). En este sentido una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de cuantificación y de detección, ya que lo que definirá estos límites es la relación entre el ruido y la señal debida al analito; es decir, a este respecto siempre es preferible un sistema con bajo ruido de fondo a costa de una menor sensibilidad (Mehta, 1989).



6.1.1 Errores de tipo α y de tipo β .

Cuando un laboratorio dictamina la presencia o la ausencia de un analito en una muestra debe evitar dos tipos de errores:

- Los *falsos positivos*, denominados también errores de tipo α o de tipo I, que consisten en dictaminar la presencia de analito cuando en realidad la muestra no lo contiene.
- Los *falsos negativos*, denominados errores de tipo β o de tipo II, en los que se dictamina la ausencia de analito cuando en realidad la muestra lo contiene.

6.2. Ámbito de aplicación.

De esta definición general se derivan, no obstante una serie de cuestiones previas a resolver, tales como cuando es necesario establecer los límites de cuantificación y detección para un método de análisis y cuál es el interés en su determinación; es decir, qué aporta a la validación del método establecer dichos límites.

La guía tripartita ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis, destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite.

Por otra parte, cuando el método se define como un método de análisis de valoración de contenido en el cual siempre se trabajará en rangos muy alejados de la mínima cantidad detectable o cuantificable por el equipo, no sería necesario la determinación de éstos parámetros; no obstante, y como se ha insistido a lo largo de la Monografía, la validación permite un mejor conocimiento del método analítico, y desde este punto de vista, saber cuáles son las cantidades mínimas de analito que se podría cuantificar puede resultar muy interesante y en ocasiones útil.

6.3. Procedimientos de determinación del LD y LC.

6.3.1. Método basado en el examen visual.

En este caso, según ICH Q2B, tanto el LD como el LC podrían determinarse a partir del análisis de muestras con concentraciones conocidas y decrecientes de analito. Estableciéndose visualmente la mínima concentración detectable así como aquella concentración límite que permite cuantificar con razonable precisión y exactitud la señal obtenida. Se debería puntualizar que este procedimiento es el más indicado en el caso de métodos de análisis no instrumentales, en los que no se tiene una señal numérica, y que en opinión de los autores no resulta apropiado para determinar la dificultad que puede entrañar establecer los criterios de precisión o exactitud en una determinación visual.



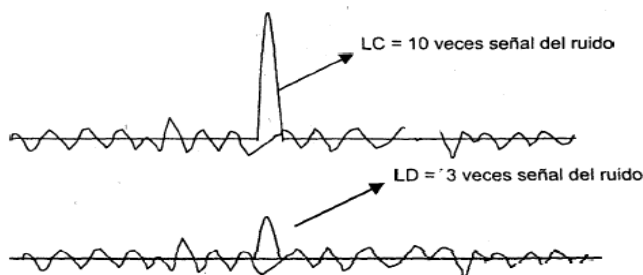
6.3.2. Método basado en la relación señal/ruido.

Este método, uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito. Es el caso de métodos instrumentales tan empleados en el campo químico-farmacéutico como la espectrofotometría UV-visible o la cromatografía de gases o líquida (HPLC).

Cuando el método de análisis se basa en alguna de estas técnicas, puede establecerse el límite de detección y cuantificación de forma teórica mediante el siguiente procedimiento:

Se establece la señal ruido que proporciona un blanco o placebo (matriz de la muestra conteniendo todos los ingredientes a excepción del analito a estudiar) a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos). Para métodos espectrofotométricos, esto no representa ningún esfuerzo puesto que el analista puede obtener fácilmente la lectura de absorbancia de soluciones placebo usando las condiciones instrumentales descritas. La justificación a estos valores fue establecida de acuerdo a los intervalos de confianza de una distribución normal (Long, 1983).

Resulta evidente que una vez establecida esta concentración no se puede escapar a la comprobación experimental de que el análisis de muestras conteniendo la concentración de analito correspondiente al LD y LC teóricos conducen a los resultados esperados, y para ello se prepararán un número adecuado de muestras (habitualmente un mínimo de 6) a dichas concentraciones y se analizarán de forma que puedan obtenerse los datos para calcular la precisión y la exactitud en el LC, tal y como recomienda la guía tripartita ICH Q2B.



Este procedimiento presenta la desventaja de que en numerosas ocasiones al llevar a cabo la comprobación experimental del LC calculado, se observa que es posible obtener resultados igualmente precisos y exactos aún cuando se desciende más en la concentración límite, es decir, que en ocasiones una señal inferior a 10 veces el ruido de fondo proporciona resultados exactos y precisos, con lo que parte del trabajo realizado debe ser reconducido si se quiere llegar realmente a conocer el límite del método. De cualquier manera es posible



que no sea necesario alcanzar el verdadero límite del método siempre y cuando el LC encontrado sea inferior al 50% del valor límite de las especificaciones de impurezas.

6.3.3. Método basado en la desviación estándar de la respuesta, del blanco y la pendiente de la recta de calibrado.

De acuerdo con la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), puede calcularse el LD y LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito. La expresión a aplicar para este cálculo varía en función de si el método instrumental empleado corrige la señal frente a un blanco o no.

6.3.3.1 Métodos Instrumentales que corrigen la señal frente a un blanco.

Este caso correspondería a un método espectrofotométricos el que se podría calcular el LD y LC teóricos mediante la expresión:

$$C_L = \frac{K \cdot S_{b1}}{b} \quad (\text{Ec. 16})$$

Donde:

- CL= concentración de analito en el límite de cuantificación o detección.
- K= constante que usualmente se considera igual a 10 para el LC e igual a 3 para el LD.
- S_{b1}= desviación estándar correspondiente a la señal del blanco o placebo.
- b= pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración de analito. Evidentemente el rango de esta recta tiene que ser cercano en concentraciones a los niveles límite de cuantificación.

Si el método analítico realiza la lectura final por duplicado o triplicado, mejorando con ello la precisión, se ha de introducir en la fórmula el término correspondiente a las réplicas (n) en la siguiente forma:

$$C_L = \frac{K \cdot S_{b1}}{b \cdot \sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 17})$$

6.3.4 Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el cálculo, en ocasiones costoso en tiempo, como se ha podido observar, de la señal media del blanco y su desviación estándar.



Para ello el método utiliza igual que el expuesto con anterioridad la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los límites esperados, pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje Y corresponderá teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero de analito. De la misma manera se sustituye en la fórmula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco. Experimentalmente, consiste pues en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación y calcular la ecuación de la recta Respuesta frente a Concentración.

6.3.5 Método experimental de cálculo para el LC (Método EURACHEM).

Cuando no se existe la posibilidad de tener una muestra placebo o cuando se especifica un criterio concreto de precisión y exactitud, un método experimental, sencillo y eficaz, para el cálculo del LC, es el método EURACHEM (EURACHEM, 1993).

Consiste en preparar una serie de muestras con cantidades decrecientes de analito y analizar cada una de ellas 6 veces consecutivas, representando CV (%) de la precisión frente a la concentración de cada muestra.

Normalmente se fija un criterio de precisión de un CV=10% en el límite de cuantificación, aunque se puede llegar a aceptar hasta un 20%, en función de las características del método. Como es obvio habrá también que fijar un criterio de exactitud que puede asociarse al siguiente intervalo de confianza:

$$\left(\frac{R_m + CV * t_{n-1}}{\sqrt{n}}, \frac{R_m - CV * t_{n-1}}{\sqrt{n}} \right) \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde:

- R_m = recuperación media.
- n = número de ensayos.
- t_{n-1} = t de Student para $n-1$ grados de libertad.

Siempre que el valor del 100% este incluido dentro del intervalo puede considerarse exacto en el nivel de concentración propuesto.



Otra posibilidad pasa por considerar como aceptable la exactitud si la recuperación media se encuentra entre los márgenes establecidos en la siguiente tabla que fija su relación con la concentración de analito en la muestra (AOAC, 1993):

% Concentración	Unidades	% Recuperación admitido
100	100%	98-102
>10	10%	98-102
>1	1%	97-103
>0.1	0.1%	95-105
0.01	100 ppm	90-107
0.001	10 ppm	80-110
0.0001	1 ppm	80-110
0.00001	100 ppb	80-110
0.000001	10 ppb	60-115
0.0000001	1 ppb	40-120

7. ROBUSTEZ.

7.1. Definición.

La guía ICH Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

La robustez (Robustness) no debe confundirse con el término Ruggedness. Este último no se menciona en las guías ICH, pero si en la Farmacopea USP esta define el término Ruggedness como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, lotes de reactivos, días, tiempos, diferentes temperaturas, etc. Es decir, se sigue el método analítico dentro de los parámetros especificados en él, pero introduciendo en las condiciones experimentales las variaciones habituales de laboratorio a laboratorio. Da una idea de la influencia que tienen las variables ambientales y operacionales del método en los resultados, por lo que podría asimilarse al término Reproducibilidad.



7.2. Ámbito de aplicación.

Aunque tanto las guías ICH como la USP definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, no es considerado, todavía, un requisito necesario para registro de especialidades, sino que se trata de un estudio que surgió con el fin de resolver los problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios. En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provocaba serias dificultades en la equivalencia entre los resultados de ambos centros de análisis, de modo que con el fin de identificar los factores potencialmente críticos surgió la necesidad de evaluar las fuentes de variación del método de análisis.

Por esta misma razón, las guías ICH recomiendan incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero. Incluso después de realizar el estudio de robustez podría concluirse que se debe modificar algún parámetro del método, obligando a la consiguiente revalidación de los puntos necesarios. Se considera por tanto que antes de fijar los parámetros analíticos y redactar el método a validar, es recomendable hacer un estudio de robustez de forma que una vez fijados los márgenes en los que el método es robusto, se pudieran incluir éstos como parte del método final, dotándolo así de una cierta flexibilidad. Es decir se tendría una justificación válida que apoyaría la modificación de ciertos parámetros en el caso de que fuera necesario. Por el contrario, en el caso de los factores más críticos, debe hacerse mención especial de la importancia que tiene ajustar el valor o seguir el procedimiento al pie de la letra.

Todos los métodos, sea cual sea la técnica empleada, son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez. Algunos pueden tener muchos parámetros sobre los que actuar y otros menos. Además éstos no tienen porque ser sólo factores relacionados con la medida final, sino que pueden ser de cualquier etapa del procedimiento analítico, como por ejemplo la preparación de la muestra. Por esto, la primera etapa del estudio es precisamente analizar todo el método y definir qué factores son los que se espera que influyan más en el resultado final.

7.3. Procedimiento de determinación de la robustez.

Al planificar el estudio de robustez de un método hay que tener en cuenta los aspectos siguientes:



- a) **Elegir los factores cuya influencia se desea evaluar.** Algunos factores típicos serían:
- pH del medio.
 - Concentración de algunos reactivos.
 - Orden de adición de los reactivos.
 - Composición de la fase móvil en cromatografía de líquidos.
 - Caudal de la fase móvil en cromatografía.
 - Temperatura.
 - Longitud de onda o potencial al cual se realizan las medidas.
- b) **Elegir los valores de dichos factores.** Generalmente se estudian dos valores situados alrededor del valor indicado en el procedimiento (valor nominal), situados a una distancia del mismo como la que se podría producir durante la utilización rutinaria del método en el laboratorio.
- c) **Elegir la respuesta cuya variación se quiere controlar.** Por ejemplo:
- La exactitud del resultado.
 - La precisión.
 - La resolución de una separación cromatográfica.
- d) **Planificar y llevar a cabo los análisis.** Una posibilidad consiste en la aplicación de una estrategia univariante en la que la influencia de los distintos factores se estudia de forma sucesiva, mientras los restantes se mantienen constantes. Sin embargo, se podría ocurrir que los factores no fueran independientes entre sí; por esta razón, y también para ahorrar experimentos, es conveniente recurrir a un estudio multivariante basado en algún tipo de diseño factorial.
- e) **Evaluar los efectos de los distintos factores.** Una vez realizados los análisis y obtenidas las respuestas, es necesario tratar estadísticamente los datos obtenidos con objeto de ver qué factores producen unos efectos significativos sobre la respuesta. El análisis de la varianza es una herramienta muy útil para llevar a cabo este tipo de tratamiento.



III. INCERTIDUMBRE.

1. Definición.

Es un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al “mesurando”.

El parámetro puede ser una desviación estándar o el ancho de un intervalo de seguridad.

En muchos casos de análisis químico, el mesurando será la concentración de un analito. La definición de incertidumbre antes mencionada se enfoca en el rango de valores que el analizador cree que podría, razonablemente, ser atribuido al mesurando.

La palabra incertidumbre se relaciona con el concepto general de duda, se refiere o al parámetro asociado con la definición mencionada, o al conocimiento limitado a cerca de un valor particular. La incertidumbre de la medición no implica una duda a cerca de la validación de una medición; por el contrario, el conocimiento de la incertidumbre implica confianza creciente en la validación del resultado de una medición.

2. Componentes de la Incertidumbre.

Para estimar la incertidumbre total puede ser necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarla separadamente para obtener la contribución de dicha fuente. Cada una de las contribuciones separadas de la incertidumbre es conocida como un componente de la incertidumbre. Cuando un componente es expresado como una desviación del patrón, este componente de la incertidumbre es conocido como una **incertidumbre patrón**.

Para resultado de la medición de la incertidumbre total, calificada de **incertidumbre estándar combinada** y denotada $uc(y)$, es una desviación estándar estimada igual a la raíz cuadrada positiva de la variación total obtenida al combinar todos los componentes de la incertidumbre.

En química analítica una **incertidumbre expandida** U_e provee un intervalo dentro del cual el valor del mesurando permanece con un nivel más alto de seguridad. La U_e es obtenida al multiplicar $uc(y)$, la incertidumbre estándar combinada por un **factor de cobertura** k . la escogencia del factor k está basada en el nivel de seguridad deseado. Para un nivel de seguridad de 95%, k es 2.

3. Error e Incertidumbre.

Es importante distinguir entre error e incertidumbre. El **error** es definido como la diferencia entre el resultado individual y el **valor verdadero** de la medición. Como tal, el error es un valor único. En principio el valor de un error conocido puede ser aplicado como una corrección para el resultado.



La **incertidumbre**, por otro lado toma la forma de un rango y, si es estimada para un procedimiento analítico y un tipo de muestra definida puede aplicarse a todas las determinaciones así descritas. En general, el valor de incertidumbre no puede ser usado para corregir el resultado de la medición.

La incertidumbre del resultado de una medición nunca debería ser interpretada como una representación del error por sí mismo, ni como la permanencia del error después de la corrección: un error es considerado que tiene dos componentes, a saber, un componente casual y un componente sistemático.

4. Proceso de estimación de la medición de la incertidumbre.

La estimación de la incertidumbre (ver figura 19 en anexos) es simple al principio. Los pasos comprendidos son:

4.1. Paso 1: Especificar el mesurando.

La especificación del mesurando requiere tanto de un informe claro y sin ambigüedades de lo que está siendo medido, como de una expresión cuantitativa relacionando el valor del mesurando a los parámetros de los cuales este depende. Estos parámetros pueden ser otros mesurandos, cantidades que no están directamente medidas, o constantes. También debería estar claro si el paso del muestreo esta o no está incluido, dentro del procedimiento. Si está incluido, la estimación de las incertidumbres asociadas con el procedimiento de la muestra necesita ser considerada.

En la medición analítica, es particularmente importante distinguir entre mediciones intentadas para producir resultados que son independientes del método usado, y estas que no son hechas con este propósito, las últimas son referidas como métodos empíricos.

4.2. Paso 2: Identificación de las Fuentes de Incertidumbre.

Una lista comprensiva de las fuentes relevantes de la incertidumbre debería ser hecha. En esta etapa, no es necesario preocuparse a cerca de la cuantificación de los componentes individuales; el objetivo es estar completamente claro a cerca de que debería ser considerado. El diagrama causa y efecto es una manera muy conveniente de listar las fuentes de la incertidumbre, al mostrar como estas se relacionan unas con otras e indicar sus influencias sobre la incertidumbre de los resultados.

Las fuentes típicas de la Incertidumbre son:

En la práctica la incertidumbre del resultado puede provenir de diferentes fuentes posibles:



- **Muestreo:** Sea que el muestreo propio del campo, el muestreo forma parte del procedimiento especificado, los efectos como variaciones al azar ente diferentes muestras y algún potencial para el sesgo en el procedimiento de muestreo, forma los componentes de la incertidumbre que afectan el resultado final.
- **Condiciones de Almacenamiento:** Donde las partes de la prueba son almacenadas por cierto periodo antes del análisis, las condiciones de almacenamiento pueden afectar los resultados. La duración del almacenamiento tanto como las condiciones durante el almacenamiento deberían, por consiguiente, ser consideradas como fuentes de incertidumbre.
- **Efectos de los instrumentos:** Los efectos de los instrumentos pueden incluir, por ejemplo, los límites de exactitud de la calibración de un balance analítico; un controlador de temperatura que pueda mantener una temperatura de la media la cual difiere (dentro de las especificaciones) de sus puntos establecidos e indicados; un auto-analizador que podría estar sujeto a efectos sobrantes.
- **Pureza del Reactivo:** La concentración de una solución volumétrica no será conocida exactamente aun cuando el material de origen ha sido experimentado, así que algunas incertidumbres asociadas al procedimiento de experimentación persisten. Varias materias colorantes orgánicas, por ejemplo, no son 100% puras y pueden contener isómeros y sales inorgánicas. La pureza de tales sustancias es usualmente expresadas por los fabricantes como siendo no menos de un nivel específico. Algunas suposiciones a cerca del grado de pureza introducirá un elemento de incertidumbre.
- **Estequiometría Asumida:** Donde un proceso analítico es asumido a que siga una estequiometria de reacción particular, puede ser necesario permitir la expulsión de la estequiometria esperada o para la reacción completa o para las reacciones secundarias.
- **Condiciones de la Medición:** Por ejemplo, un articulo de cristal volumétrico puede ser usado a una temperatura diferente a la usada cuando este fue calibrado los efectos de la temperatura total deberían ser corregidos, pero cualquier incertidumbre en la temperatura del líquido y del cristal debería ser considerada. Similarmente, la humedad puede ser importante donde los materiales son sensitivos a los posibles cambios de la humedad.
- **Efectos de la muestra:** La recuperación de cualquier analito de una matriz compleja, o la respuesta de un instrumento, puede ser afectada por la composición de la matriz. La especificación del analito puede combinar más este efecto. La estabilidad de una muestra/analito puede cambiar durante el análisis a causa de un cambio de régimen



termal o de un efecto fotolítico. Cuando un “spike” es usado para estimar la recuperación, la recuperación del analito de la muestra puede diferir de la recuperación del spike, introduciendo una incertidumbre que necesita ser evaluada.

- **Efectos del Cálculo:** La selección del modelo de calibración, por ejemplo, usar una calibración de línea recta en una respuesta curva, nos lleva a un ajuste más pobre y a una incertidumbre mas grande. El truncamiento y redondeo puede llevarnos a inexactitudes en el resultado final. Como estos son raramente predecibles, una concesión en la incertidumbre puede ser necesaria.
- **Blanco de Corrección:** Habrá incertidumbre en el valor y en la propiedad del blanco de corrección. Esto es particularmente importante en el análisis de indicios.
- **Efectos del Operador:** Posibilidad de leer alto o bajo un medidor o escala consistentemente. Posibilidad de hacer una interpretación ligeramente diferente del método.
- **Efectos Casuales:** Los efectos casuales contribuyen con la incertidumbre en todas las determinaciones.

4.2.1. Diagrama de Ishikawa (DI).

El diagrama causa-efecto o diagrama de Ishikawa es un método gráfico que refleja la relación entre la incertidumbre asociada al mesurando y los factores que posiblemente contribuyen a que exista. En otras palabras, es una gráfica que relaciona el efecto (problema) con sus causa potenciales.

El diagrama de Ishikawa es una gráfica en la cual, en el lado derecho, se anota el problema, y en el lado izquierdo se especifican por escrito todas sus causas potenciales, de tal manera que se agrupan o estratifican de acuerdo con sus similitudes en ramas y subramas.

- **Pasos para la construcción de un diagrama de Ishikawa.**

- a. Escoger las fuentes que tienden a generar incertidumbre asociado al mesurando, se puede hacer con la ayuda de un diagrama de Pareto, un Histograma o una carta de control. En general, es importante que se tenga una cuantificación objetiva de la magnitud del problema.



- b. Escribir de manera clara y concreta los efectos que puedan afectar los resultados a la derecha del diagrama. Trazar una flecha ancha de izquierda a derecha, y decidir qué tipo de DI se va a usar.
- c. Buscar todas las causas probables, lo más concretas posibles, que pueden afectar al mesurando.
- d. Decidir cuáles son las causas más importantes.

4.3. Paso 3: Cuantificar los componentes de la incertidumbre.

Es medir o estimar el tamaño de los componentes de la incertidumbre asociados con cada fuente potencial de la incertidumbre identificada. Es a menudo posible estimar o determinar una sola contribución de la incertidumbre asociada con un número de fuentes separadas.

4.3.1. Procedimiento de Evaluación de la incertidumbre.

El procedimiento usado para estimar la incertidumbre total depende de los datos disponibles a cerca del rendimiento del método. Las etapas involucradas para desarrollar el procedimiento son:

- **Reconciliar los requisitos de los datos disponibles.**

La lista de las fuentes de la incertidumbre debería ser examinada para ver cuál de las fuentes cuenta con los datos disponibles.

- **Plan para obtener más datos requeridos.**

Para las fuentes de la incertidumbre que no están cubiertas adecuadamente por los datos existentes.

- **Evaluación de la incertidumbre por cuantificación de los componentes individuales.**

En algunos casos, particularmente cuando muy pocos o ningún dato del rendimiento del método está disponible, el procedimiento más apropiado puede ser, evaluar cada componente de la incertidumbre separadamente.

El procedimiento general usado para combinar los componentes individuales es preparar un modelo cuantitativo detallado del procedimiento experimental, evaluar las incertidumbres estándares asociadas con los parámetros de entradas individuales, y combinarlas usando la ley de propagación de la incertidumbre.



4.3.2. Ley de la Propagación de la Incertidumbre.

La incertidumbre estándar de un mensurando que depende de variables analíticas (concentración de estándar certificado, pureza, peso de muestra, factores de dilución, parámetros ambientales, datos de validación, etc.), se obtiene por combinación de las incertidumbres estándares de las diferentes observables a través de la ley de la propagación de la incertidumbre (o propagación de errores). Existen dos casos: cuando las variables son independientes y cuando están correlacionadas.

4.3.3. Estimación de la Incertidumbre usando desarrollo propio y estudios de validación.

Un desarrollo propio y los estudios de validación consisten, principalmente, de la determinación de los parámetros de rendimiento del método.

Estudios de Precisión.

La precisión debería ser estimada tanto como sea posible por un periodo largo de tiempo y escogida que permita la variación natural de todos los factores que afectan el resultado. Esto puede ser obtenido con:

- La desviación estándar de los resultados de una muestra típica analizada varias veces por un periodo de tiempo, usando diferentes analizadores y equipos donde sea posible.
- La desviación estándar obtenida de análisis repetidos realizados en cada una de las diferentes muestras.

Estudio del sesgo.

El sesgo total es mejor estimado por el análisis repetido de un material de referencia certificado usando el procedimiento completo de mediciones. La incertidumbre asociada con el sesgo es simplemente la combinación de la incertidumbre estándar del material de referencia certificado con la desviación estándar asociada con el sesgo.

Factores adicionales.

Los efectos de cualquiera de los factores restantes deberían ser estimados separadamente, o por una variación experimental o por la predicción de una teoría establecida. La incertidumbre asociada con tales factores debería ser estimada, registrada y combinada con otras contribuciones de una manera normal.



4.3.4. Cuantificación de los Componentes Individuales.

Es necesario considerar algunas fuentes de la incertidumbre individualmente. En algunos casos, solo es necesario para un número pequeño de fuentes, en otros cuando una pequeña o ningún dato del rendimiento del método está disponible. Hay diferentes métodos generales para establecer estos componentes:

- ✓ **Variación experimental de las variables de entrada:** a menudo es posible y práctico obtener los estimados de las contribuciones de la incertidumbre de estudios experimentales específicos para parámetros individuales. Originada por efectos de azar, es muchas veces medida por experimentos y cuantificada en términos de desviación estándar de valores medidos.
- ✓ **Estimación basada en otros resultados o datos:** estimar algunas de las incertidumbres estándares usando todos los datos relacionados que esté disponible a cerca de la incertidumbre de las cantidades concernientes.
- ✓ **Modelado según principios teóricos:** una teoría física bien establecida proporciona modelos buenos para los efectos de los resultados, las incertidumbres pueden ser calculadas o estimadas según la forma de relacionarse usando los métodos de propagación de la incertidumbre.
- ✓ **Estimación basada en criterios de experiencia o datos modelado de suposiciones:** la evaluación no es ni una tarea de rutina ni puramente matemática, esta depende del conocimiento detallado de la naturaleza del mesurando y del método de medición y el procedimiento usado, al final, depende del entendimiento, del análisis crítico y de la integridad de todos los que contribuyen con la asignación de este valor.

4.4. Paso 4: Cálculo de la Incertidumbre Combinada.

4.4.1. Incertidumbres Estándares $u(x_i)$.

Cuando la incertidumbre se expresa como desviación estándar. Antes de la concentración, todas las contribuciones de la incertidumbre deben ser expresadas como incertidumbres estándares, esto es, derivaciones estándares. Esto puede incluir la conversión de alguna otra medición de dispersión.



4.4.2. Incertidumbre estándar combinada (u_c).

Cuando los resultados son obtenidos por combinación de incertidumbres estándares de otras variables, a través de la propagación de la incertidumbre. La relación general entre la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$ de un valor y y la incertidumbre de los parámetros independientes $x_1, x_2 \dots x_n$ sobre los que depende la relación es:

$$u_{u_c}(y(x_1 \dots x_2 \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 \cdot u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1,n} u(y, x_i)^2} \quad (\text{Ec. 19})$$

Donde $y(x_1 \dots x_2 \dots)$ es una función de los parámetros diferentes $x_1 \dots x_2 \dots$, c_i es un coeficiente de precisión evaluado como $c_i = \partial y / \partial x_i$, la diferencia parcial de y con respecto a x_i y $u(y, x_i)$ denota la incertidumbre de y originada de la incertidumbre x_i . Cada contribución de la variable $u(y, x_i)$ es justamente el cuadrado de la incertidumbre asociada expresada como una desviación estándar multiplicada por el cuadrado del coeficiente de precisión pertinente. Estos coeficientes de sensibilidad describen cómo el valor y varía con los cambios en los parámetros x_1, x_2 .

Donde las variables no son independientes, la relación es más compleja:

$$u_{u_c}(y(x_1 \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 \cdot u(x_i)^2 + \sum_{\substack{i,k=1,n \\ i \neq k}} c_i c_k \cdot u(x_i, x_k)} \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde $u(x_i, x_k)$ es la covarianza entre x_i y x_k es un coeficiente de precisión evaluado como lo descrito la covarianza está relacionada con el coeficiente de correlación r_{ik} por:

$$u(x_i, x_k) = u(x_i) \cdot u(x_k) \cdot r_{ik} \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde $-1 \leq r_{ik} \leq 1$

4.4.3. Incertidumbre Expandida o Total (U_c).

Se define como el intervalo dentro del cual se asegura cae el resultado de la medición del mensurando con un grado de confianza especificado. La etapa final es multiplicar la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura escogido para obtener una incertidumbre expandida, esta es requerida para proporcionar un intervalo el cual puede que abarque una gran fracción de la distribución de valores que podrían razonablemente ser



atribuidos al mesurando. Para escoger un valor para el factor de cobertura k , deben considerarse estos puntos:

- Nivel de seguridad requerido.
- Algún conocimiento de las distribuciones básicas.
- Algún conocimiento del número de valores usados para estimar los efectos al azar.

4.5. Paso 5: Reporte de la Incertidumbre.

Los datos necesarios para reportar el resultado de una medición dependen de su uso propuesto. Los principios de orientación son:

- Presentar datos suficientes para permitir que el resultado sea re-evaluado si nuevos datos están a la disposición.
- Es preferible equivocarse en el sentido de suministrar muchos datos más que muy pocos datos.

4.5.1. Datos Requeridos.

Un reporte completo del resultado de las mediciones debería incluir o referirse a la siguiente documentación:

- Una descripción de los métodos usados para calcular el resultado de la medición y su incertidumbre según las observaciones experimentales y datos nuevos.
- Los valores y las fuentes de todas las correcciones y constantes usadas tanto en el cálculo como en el análisis de la incertidumbre.
- Una lista de los componentes de la incertidumbre con toda la documentación sobre cómo cada componente fue evaluado.

Los datos y los análisis deberían ser presentados de tal forma que sus pasos importantes pueden ser trazables y el cálculo de los resultados repetido si es necesario.

4.5.2. Reporte de la Incertidumbre Estándar.

Cuando la incertidumbre es expresada como la incertidumbre estándar combinada u_c (esto es, como una desviación estándar sola) el siguiente modelo es recomendado:

“(Resultado): x (unidades) [con una] incertidumbre estándar de u_c (unidades) [donde la incertidumbre estándar corresponde a una desviación estándar]”



4.5.3. Reporte de la Incertidumbre Expandida.

El resultado x debería ser expresado junto con la incertidumbre expandida U calculada usando un factor de cobertura $k=2$. El siguiente modelo es recomendado:

“(Resultado): $(x \pm U)$ (inits)”

Donde la incertidumbre reportada es calculada usando un factor de cobertura de 2 (el cual da un nivel de confianza de aproximadamente 95%).

4.5.4. Expresión Numérica de los Resultados.

Los valores numéricos del resultado y su incertidumbre no deberían ser dados con un número excesivo de dígitos y ser de cifras completas para ser consistentes con la incertidumbre dada.

Cumplimiento vs Límites.

El cumplimiento reglamentario a menudo requiere que un mesurando demuestre que está dentro de unos límites particulares. Asumir que los límites fueron establecidos sin permiso para la incertidumbre, cuatro situaciones son aparentes para el caso de cumplimiento con su límite superior:

- i) El resultado y la incertidumbre expandida exceden el valor límite.
- ii) El resultado el valor limitativo pero no así la incertidumbre expandida.
- iii) El resultado está por debajo del valor limitativo pero no así la incertidumbre expandida.
- iv) El resultado y la incertidumbre expandida están por debajo del valor limitativo.

-Caso i: Es normalmente interpretado como una clara demostración de no- cumplimiento.

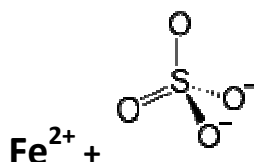
-Caso iv: Es normalmente interpretado como una demostración de cumplimiento.

-Caso ii y iii: Normalmente requieren una consideración individual a la luz de cualquier acuerdo con el usuario de los datos. Argumentos análogos se aplican en el caso de cumplimiento con un límite inferior.



IV. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SULFATO FERROSO.

- **Fórmula Estructural y Empírica del Sulfato Ferroso:**



- **Peso Molecular FeSO₄ Anhidro:** 151.91 g/mol.
- **Peso Molecular FeSO₄ Heptahidratado:** 278.02 g/mol.
- **Familia Química:** Sulfatos.
- **Sinónimos:** Sal de hierro (2+) del ácido sulfúrico (1:1), heptahidratado.
- **Nombre Químico:** Sulfato de Hierro (II) (1:1) heptahidratado.
- **Contenido:** El sulfato ferroso contiene una cantidad de FeSO₄ equivalente a no menos de 99.5% y no más de 104.5% de FeSO₄·7H₂O.
- **Estado físico, color, sabor y olor:** Cristales verdes azulados o verde claro, polvo cristalino, sin olor. Eflorescente en el aire seco, volviéndose blanco. Se oxida en el aire húmedo, convirtiéndose en marrón (sulfato férrico). Sabor astringente, salino.
- **Solubilidad:** Fácilmente soluble en agua, muy soluble en agua hirviendo, prácticamente insoluble en etanol (96%).
- **Densidad:** 1898 Kg/m³; 1,898 g/cm³.
- **Punto de Fusión:** 64°C.
- **Punto de Ebullición:** 90°C (se convierte en monohidrato).
- **pH:** 3.0 a 4.0.
- **Pruebas de Identificación:**



- Arsénico:** transferir 1.0 g a un balón de fondo redondo de 100 mL con junta de vidrio, agregar 40 mL de ácido sulfúrico 9N y 2 mL de solución de bromuro de potasio (3 en 10) e inmediatamente conectar el matraz a un condensador con junta de vidrio y un recipiente con una camisa que se enfría con agua helada. Calentar moderadamente el matraz sobre una llama baja hasta que el sólido se disuelva, luego destilar hasta que se recolecten 25 mL de destilado en el recipiente. Transferir este destilado al matraz generador de arsina y lavar el condensador y el recipiente con varias porciones pequeñas de agua, agregando los lavados al matraz generador. Agitar por rotación moderada para mezclar, agregar bromo SR hasta que el color de la solución sea levemente amarillo y diluir con agua a 35 mL. El límite es 3 ppm.
- Plomo:** usando sulfato ferroso, proceder como se indica en la prueba para plomo en gluconato ferroso: el límite es 0.001%.

- **Métodos de análisis:**

- Especialidad farmacéutica:**

En la siguiente tabla se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de sulfato ferroso según su forma farmacéutica y farmacopeas oficiales.

Bibliografía	Forma Farmacéutica	Método de Análisis
Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXXII)	Tabletas	Espectrofotometría de Absorción Atómica.
	Solución oral	Espectrofotometría de Absorción Atómica.
	Jarabe	Espectrofotometría de Absorción Atómica.
Farmacopea Británica (BP 2009)	Tabletas	Espectrofotometría de Absorción Atómica.
	Suspensión oral	Espectrofotometría de Absorción Atómica.

- **Materia prima:**

En la siguiente tabla se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de sulfato ferroso (materia prima) según bibliografías oficiales de análisis.

Referencia	Método de Análisis
Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXXII)	Espectrofotometría de Absorción Atómica.



Farmacopea Británica (BP 2009) Espectrofotometría de Absorción Atómica.

V. PROPIEDADES FÁRMACO-TERAPÉUTICAS DEL SULFATO FERROSO.

- **Categoría farmacológica:** Antianémico.

Aunque el hierro abunda en la naturaleza, no resulta fácilmente disponible para el hombre dado que se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos férricos o en forma de polímeros, formas que son poco aptas para la absorción. La importancia del hierro en el organismo se basa en el papel indispensable que desempeña en la composición y la función de la hemoglobina como elemento esencial de transporte de oxígeno a los tejidos, de mioglobina, de las enzimas con estructura hem (citocromos microsómicos y mitocondriales, catalasas y peroxidasas), de las enzimas metaloflavoproteínas (xantinoxidasa y otras oxidasas mitocondriales).

- **Mecanismo de acción:** El hierro es un componente esencial en la formación fisiológica de hemoglobina de la que son necesarias cantidades adecuadas para la eritropoyesis efectiva y la capacidad resultante de transportar oxígeno de la sangre. El hierro tiene una función similar en la producción de mioglobina. El hierro también sirve como cofactor de varias enzimas esenciales. Cuando se toma por vía oral en alimentos o como suplemento el hierro pasa a través de las células mucosas en estado ferroso y se une a la proteína transferrina. En esta forma el hierro es transportado en la proteína transferrina. En esta forma el hierro es transportado en el organismo a la médula ósea para la producción de glóbulos rojos.

- **Características Farmacocinéticas:**

- **Absorción:** La absorción aumenta cuando los depósitos de hierro están vacíos o cuando aumenta la producción de glóbulos rojos. Por el contrario, elevadas concentraciones sanguíneas de hierro disminuyen la absorción. Personas con deficiencia de hierro: Se absorbe del 20 al 30 %, siendo la cantidad aproximadamente proporcional al grado de deficiencia. Persona sin deficiencia de hierro: Se absorbe del 3 al 10 % del hierro ingerido. La absorción se produce principalmente en el duodeno y yeyuno proximal. La absorción es más eficaz cuando el hierro se ingiere en su forma ferrosa que cuando está en forma férrica, con el estómago vacío. Cuando se toma con alimentos, la cantidad de hierro absorbida se puede reducir en 1/2 a 1/3 de la ingerida con el estómago vacío.

- **Unión a proteínas:** Muy elevada (90% o más). Hemoglobina: Elevada. Mioglobina, enzimas y transferrina: Baja. Fecritina y hemosiderina: Baja.



- **Vida media:** 6 horas.

-**Distribución:** Los iones de hierro pasan a la sangre, uniéndose inmediatamente a la transferrina y a la glicoproteína B, globulina que las llevan a la médula ósea donde se incorporan a la hemoglobina. Las pequeñas cantidades de exceso se estacionan en las vellosidades epiteliales donde sufren oxidación, que después de dicho proceso son excretados en heces. El cuerpo de un adulto sano varón contiene aproximadamente 50 mg/kg de peso, mientras que el de una mujer adulta contiene 35 mg/kg de peso. El hierro se encuentra en los seres humanos en forma proteica o en moléculas de Heme.

-**Eliminación:** No existe un sistema fisiológico de eliminación para el hierro y se puede acumular en el organismo en cantidades tóxicas; sin embargo, diariamente se pierden pequeñas cantidades en la muda de la piel, cabello y uñas, y en heces, sudores, leche materna (de 0,5 a 1,0 mg al día), sangre menstrual y orina. La pérdida diaria media de hierro para adultos sanos es: Hombres: 1 mg al día. Mujeres: Postmenopáusicas: 1 mg al día. Mujeres adultas sanas premenopáusicas: 1,5 mg al día. No se debe administrar hierro por más de 6 meses a menos que el paciente presente un sangrado continuo o existan embarazos repetidos.

- **Indicaciones:** Prevención y tratamiento de anemia por deficiencia de hierro que resulta de una dieta inadecuada, mala absorción, embarazo y/o pérdida de sangre. Quemados. Gastrectomía. Hemodiálisis. Hemorragia. Enfermedades intestinales tales como: inflamación intestinal, diarrea, enfermedad celíaca, enfermedad del Crohn's, diarrea y sprue. Embarazo. Lactancia. Ancianos con deficiencia de hierro. Cuando se administran ciertos medicamentos tales como: antiácidos, suplementos de calcio, penicilamina, suplementos de cinc, epoetina, trientina y cualquier medicamento que cause sangramiento del tracto gastrointestinal. La causa de los estados deficitarios de hierro siempre se debe determinar, ya que se puede relacionar con un estado grave.

- **Contraindicaciones:** Hipersensibilidad al hierro. Hemocromatosis. Hemosiderosis. Otros estados anémicos a no ser que se acompañen por deficiencia de hierro. Pacientes con anemia hemolítica a menos que coexista con deficiencia de hierro. No se debe administrar cuando haya transfusiones sanguíneas repetidas. Pacientes con antecedentes de úlcera péptica, enteritis regional o colitis ulcerativa y gastritis.

- **Precauciones y Advertencias:** La relación riesgo-beneficio debe evaluarse en los siguientes casos: alcoholismo activo o tratado; alergias; asma; hepatitis o disfunción hepática; enfermedad renal aguda infecciosa; estados inflamatorios del tracto intestinal, tales como enteritis, colitis, diverticulitis y colitis ulcerosa; pancreatitis; úlcera péptica y artritis reumatoide. También se recomienda tener precaución con repetidas transfusiones de



sangre, ya que la adición de un elevado contenido de hierro eritrocítico puede producir sobrecarga de hierro. Tragar las tabletas enteras. Mantener fuera del alcance de los niños. No se debe administrar concomitantemente presentaciones orales con hierro parenteral.

- **Reacciones Adversas:** Cuando las preparaciones de hierro se toman por vía oral, las heces generalmente se vuelven negras. Esto lo produce la presencia de hierro no absorbido y es inofensivo. Sin embargo, casos raros de hemorragia en el tracto gastrointestinal también pueden dar lugar a heces negras de una consistencia pegajosa, acompañadas a menudo por otros síntomas tales como: bandas rojas en las heces, calambres, inflamación o dolores agudos en el estómago o en la región abdominal. En estos casos raros se necesita atención médica para la evaluación adecuada de la causa. Son de incidencia más frecuentes: dolor, calambres o inflamación abdominal o estomacal, náuseas y vómitos. Son de incidencia menos frecuentes: dolor de garganta o pecho, especialmente al tragar, o heces conteniendo sangre fresca o digerida. Estreñimiento. Orina oscurecida. Diarrea. Pirosis.

- **Vía de Administración y Dosis:**

- **Adultos (18 años y mayores):** La asignación diaria recomendada (RDA) para hombres (19- 50 años) es 8 mg al día; para mujeres (19- 50 años) es 18 mg al día; para adultos (51 años y mayores) es 8 mg al día; para mujeres embarazadas (todas las edades) es 27 mg al día y para mujeres lactantes (19 años y mayores) es 9 mg al día.

El nivel máximo de consumo tolerable (UL) para adultos (19 años y mayores) es 45 mg al día. La asignación diaria recomendada (RDA) del hierro en una dieta completamente vegetariana se debe ajustar de la forma siguiente: 14 mg al día para hombres adultos y mujeres pos-menopáusicas, 33 mg al día para mujeres pre-menopáusicas y 26 mg al día para niñas adolescentes.

Se han usado dosis que oscilan entre 60 y 180 mg de hierro elemental para la deficiencia de hierro/anemia. Los proveedores médicos administran el hierro-dextrán para reabastecer las reservas agotadas de hierro en la médula espinal, de donde se incorpora a la hemoglobina. La dosis usual para un adulto es 2 mL al día (100 mg de hierro).

- **Niños (menores de 18 años):** La asignación diaria recomendada (RDA) es 11 mg para 7-12 meses; 7 mg para 1-3 años; 10 mg para 4-8 años; 8 mg para 9-13 años (niños y niñas); 11 mg para hombres de 14-18 años; 15 mg para mujeres de 14-18 años; 27 mg para mujeres embarazadas de 14-18 años; 10 mg para mujeres lactantes de 14-18 años.

Para bebés de 0-6 meses se recomiendan 0.27 mg como nivel adecuado de ingesta (IA), que se utiliza en reemplazo de la asignación diaria recomendada (RDA), cuando ésta no se puede determinar.



No es posible establecer el nivel máximo de consumo tolerable (UL) para infantes (1-12 meses); para niños (1-13 años) es 40 mg al día; para adolescentes (14-18 años) es de 45 mg al día.

- **Presentaciones:**

Blísteres de Tabletas de 125, 200, 300 y 525mg. Frascos de Solución Oral de 125mg/1mL, 200mg/5mL. También se encuentra en otros preparados en combinación con ácido fólico y suplementos vitamínicos.



DISEÑO METODOLÓGICO (MATERIAL Y MÉTODO)



- **Tipo de Estudio:** Experimental Prospectivo.

- **Población.**

La población en estudio fueron todos los blísters del lote # 7011-02 de tabletas de Sulfato Ferroso cuya concentración es de 200 mg equivalente a 60 mg de hierro elemental.

- **Muestra.**

Se tomaron 8 blisters de tabletas al azar de nuestra población total en estudio.

- **Alcance.**

Cuantificación de hierro elemental en las distintas presentaciones de tabletas de sulfato ferroso de 125 mg a 525 mg por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

- **Materiales y Equipos.**

Los materiales y equipos siguientes se utilizaron para la cuantificación de hierro elemental en las distintas presentaciones de tabletas de sulfato ferroso:

Nombre	Descripción
Espectrofotómetro de Absorción Atómica con llama (AAE ó EAA)	Espectrofotómetro Absorción Atómica: Marca VARIAN, modelo AA240. Con 4 lámparas de cátodo hueco marca VARIAN para Cu/Mn/Zn/Fe. Capacidad de corriente min. de 10mA y máx. de 20mA.
Balanza Analítica	Marca A&D; modelo GH-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.1mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 5 a 40°C y % Humedad Relativa: ≤ 85%.
Balanza Analítica	Marca: A&D; Modelo: HM-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.1mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 5 a 40°C y % Humedad Relativa: ≤ 85%.
Ultrasonic Cleaner	Marca: Brasonic; Modelo: B3-R. Baño ultrasónico para clarificar soluciones.



Pipetas automáticas	Rango de Medición: 100 a 1000 μL ; Marca: Eppendox; División Escala: $\pm 0.015\text{mL}$.
Pipetas volumétricas	Pipetas volumétricas clase A de 1 y 5 mL marca Pyrex.
Espátula	Espátula para pesar el polvo de tabletas a usar.
Balón calibrado	Balón Pyrex clase A calibrado de 100 mL
Balones	Balones Pyrex clase A de 100, 50 y 25 mL.
Vasos de Precipitación	Beaker Pyrex de 250 y 10 mL.
Probetas	Probeta de 500 y 10 mL.
Destilador de Agua	Destilador de Agua potable Marca Eppendox.
Mortero y Pilon	Mortero y pilón para triturar las tabletas.

- **Reactivos y Patrones.**

Los reactivos y patrones siguientes se utilizaron durante la ejecución de esta cuantificación:

Nombre	Grado	Descripción	Fórmula Química
Agua	Destilada.	Agua destilada densidad 1 g/ml.	H_2O
Ácido Clorhídrico	Reactivo 37% de pureza.	Líquido viscoso, muy corrosivo. Marca: Fisher.	HCl
Hierro Elemental	Estándar	Marca: Ultrascientific. Trazable con NIST.	Fe^0

- **Procedimiento analítico para llevar a cabo la metodología de cuantificación de Hierro elemental en tabletas.**

- a. **Condiciones Espectrofotométricas:**

Flujo del aire	3.5 L/min
Flujo del acetileno	1.5 L/min
Longitud de onda	248.3 nm
Anchura de rendija	0.2 nm
Corriente de lámpara	5.0 mA
Corrección de fondo	Activado
Volumen de aspiración	4-6 mL/min



b. Preparación del Blanco.

Tomar 5 mL de ácido clorhídrico concentrado con la ayuda de una pipeta volumétrica clase A de 5 mL y transferir a un matraz volumétrico clase A de 100 mL. Añadir unos 35 mL de agua destilada y agitar, continuar añadiendo agua destilada hasta llegar a la marca del aforo del matraz.

c. Preparación del Estándar.

Tomar una alícuota de 600 μ L del estándar de hierro con la ayuda de una pipeta automática de 1000 μ L y transferir a un matraz volumétrico calibrado clase A de 100 mL, disolver con unos 25 mL de agua destilada y agitar. Luego añadir 5 mL de ácido clorhídrico concentrado y aforar con agua destilada. Se sumerge el capilar en el matraz y se lee a una longitud de onda de 248.3 nm. (Concentración estándar: 6 μ g/mL).

d. Preparación de la Muestra.

Triturar 20 tabletas de sulfato ferroso con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo bastante fino. Pesar exactamente 640.25 mg de este polvo y transferir a un matraz volumétrico calibrado clase A de 100 mL, disolver con unos 35 mL de agua destilada y agitar vigorosamente. Luego añadir 5 mL de ácido clorhídrico concentrado, tapar y colocar en el Brasonic durante 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y aforar el matraz con agua destilada. Tomar de esta solución madre una alícuota de 600 μ L con ayuda de una pipeta automática de 1000 μ L y llevar a un matraz volumétrico calibrado clase A de 100 mL, agregar unos 35 mL de agua destilada y agitar, terminar de aforar el matraz con agua destilada. Se sumerge el capilar en el matraz y se lee a una longitud de onda de 248.3 nm. (Concentración muestra: 6 μ g/mL).

- **Procedimiento experimental para determinar algunos parámetros de validación aplicables a esta metodología analítica de cuantificación de hierro elemental en tabletas.**

➤ **Linealidad.**

a. Determinación experimental de la linealidad.

Se preparan 7 soluciones estándar del analito (Patrón de Hierro elemental), al 50%, 67%, 83%, 100%, 117%, 133% y 150% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo. Optimizar el equipo con la solución de más alta concentración, colocando el capilar en la misma. Luego se sumerge el capilar en el recipiente de cada una de las soluciones estándar y se procede a leer, empezando por la de concentración más baja hasta terminar con la más alta, analizándolas por triplicado. Se grafica la concentración para cada solución estándar versus la lectura obtenida (Absorbancias promedio de cada serie).



b. Datos a reportar.

- Realizar el análisis de la curva de regresión.
- Realizar la grafica de residuales.
- Verificar la validez del modelo a través del Análisis de Varianza (ANOVA).

c. Criterio de aceptación.

- El porcentaje de desviación estándar relativa de los factores de respuesta deben de ser $\leq 2.0\%$ para el sistema instrumental y del método.
- El coeficiente de correlación (r) tanto para el sistema instrumental como para el método debe de ser ≥ 0.998 .
- El coeficiente de determinación (r^2) tanto para el sistema instrumental como para el método debe ser ≥ 0.995 .

➤ **Precisión.**

a. Repetibilidad del Método.

Se prepara una solución muestra a la concentración nominal ($6 \mu\text{g/mL}$), en un solo día, por un mismo analista y analizar en el mismo instrumento de medida. Se sumerge el capilar en el recipiente de dicha solución preparada y realizar 20 lecturas en el espectrofotómetro. Se adquirieron las absorbancias de la solución y luego se procede a tabular los resultados.

b. Valores a reportar y criterios de aceptación.

- Intervalos de confianza de los resultados promedios.
- El % RSD de la Repetibilidad del método debe de ser $\leq 2.0\%$.

c. Precisión Intermedia.

Se efectúa preparando 3 soluciones a la concentración nominal de estándar y de muestra de Hierro elemental y analizar en 3 días distintos y en un mismo equipo de medida. Se sumerge el capilar en los recipientes de cada una de las soluciones y realizar 10 lecturas durante los 3 días. Obteniéndose de este modo las absorbancias de las soluciones de estándar y muestra en los diferentes días.

d. Valores a reportar y criterios de aceptación.

- Análisis de Varianza (ANOVA) para obtener la precisión intermedia del método.
- El % RSD generado durante los 3 días debe ser $\leq 2.0\%$, se realiza un ANOVA de un factor (variación de días).



➤ **Exactitud.**

a. Exactitud (recuperación) del Método de ensayo propuesto.

La exactitud de método analítico se evaluó por medio del método de la adición estándar a tres niveles de concentración, que abarque el porcentaje del rango especificado (50%, 83% y 117 % respectivamente).

Cada muestra se sumerge en el capilar del espectrofotómetro y se lee tres veces, analizándose de acuerdo a las condiciones establecidas en el método de análisis. Colocando las muestras desde la concentración más baja hasta la más alta.

Se grafica la concentración de la curva normal en función de las absorbancias obtenidas tanto para la muestra cargada con solución estándar de hierro elemental como los de la curva normal. Se comparan las pendientes de la curva de regresión normal y de adición patrón, para establecer si existe efecto de matriz. Se estima el porcentaje de recobro y su incertidumbre asociada.

b. Criterios de Aceptación:

- El porcentaje de recobro (%R) debe estar entre $98\% \leq \%R \leq 102\%$.
- El coeficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.995 .
- Si el porcentaje de recobrado es menor del 98% existe un efecto depresor; pero si el porcentaje de recobro es mayor del 102% existe un efecto amplificador en la señal de la respuesta.

➤ **Límite de Detección.**

a. Determinación experimental del límite de detección.

Para estimar el límite de detección del método de ensayo de Hierro elemental, este se determinó a través de la desviación estándar residual ($S_{x/y}$) y la pendiente de la curva de calibración por adición patrón.

b. Criterio de aceptación.

El límite de detección es igual a 3.3 veces la desviación estándar de la curva de regresión por adición patrón dividida entre su pendiente.



➤ **Límite de Cuantificación.**

a. Determinación experimental del límite de cuantificación.

Para estimar el límite de cuantificación del método de ensayo de Hierro elemental, este se determinó a través de la desviación estándar residual ($S_{x/y}$) y la pendiente de la curva de calibración por adición patrón.

b. Criterio de aceptación.

El límite de detección es igual a 10 veces la desviación estándar de la curva de regresión por adición patrón dividida entre su pendiente.



ANÁLISIS DE RESULTADOS



En esta sección se reportan los resultados del estudio de la metodología analítica de cuantificación de hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso. Para obtener los parámetros linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación se utilizaron las herramientas estadísticas y de cálculo para el análisis de datos que tiene el programa **Microsoft Office Excel 2007**, además para estimar la incertidumbre, esta se efectuó mediante el programa **Maple v12.0 2008**. Los resultados obtenidos se reflejan a continuación:



DETERMINACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.

1. LINEALIDAD.

Tabla No. 1. Lecturas obtenidas del estándar para la determinación de la Linealidad del sistema.

Concentración (mg/L)	ABSORBANCIAS			
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
3	0.0324	0.0333	0.0336	0.0359
4	0.0438	0.043	0.0455	0.0359
5	0.0537	0.0546	0.0557	0.0552
6	0.0642	0.0657	0.0648	0.0652
7	0.0763	0.0782	0.0763	0.0762
8	0.0862	0.0852	0.0828	0.0874
9	0.0961	0.0958	0.0969	0.0971

Gráfico No. 1. Análisis Gráfico de Linealidad del sistema para Hierro aplicando modelo lineal simple.

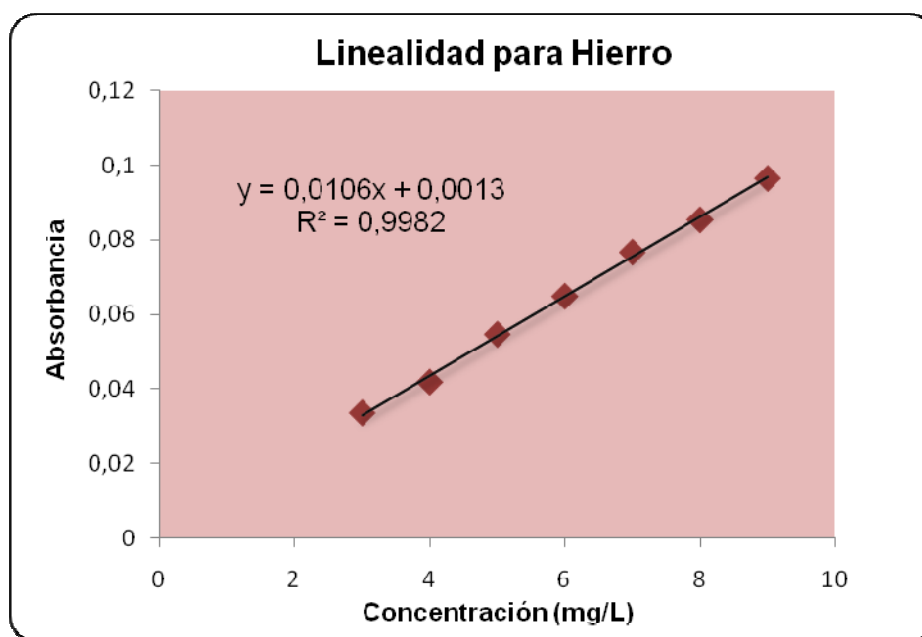
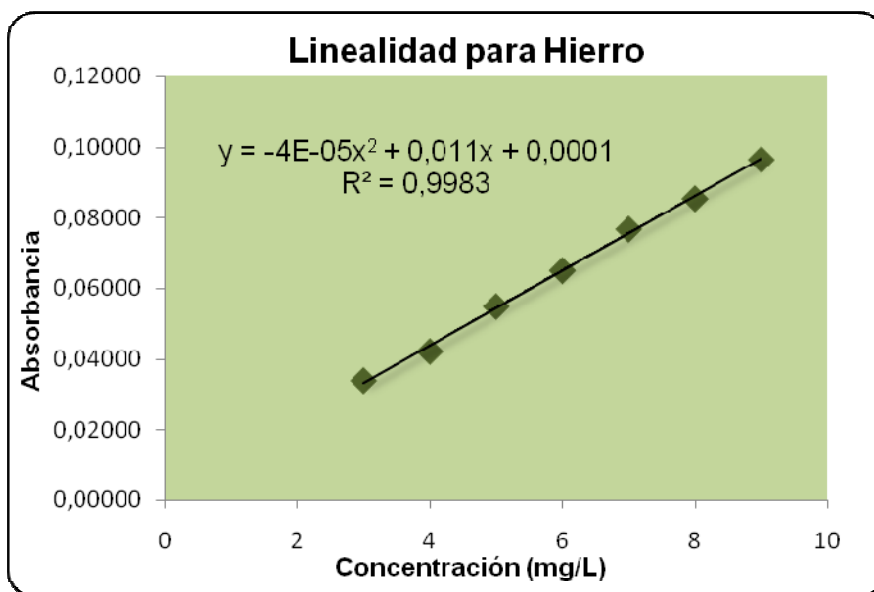




Gráfico No. 2. Análisis Gráfico de Linealidad del sistema para Hierro aplicando modelo cuadrático.



Análisis:

Para la curva de calibración a una longitud de onda de 248.3 nm a concentraciones comprendidas entre 3 y 9 mg/L reflejadas en la tabla #1, se aplicó el modelo lineal simple $y = 0.010x + 0.001$ reflejado en el gráfico #1, al mismo tiempo con los resultados obtenidos se aplicó un modelo lineal cuadrático $y = -4E-05x^2 + 0,011x + 0,0001$ reflejado en el gráfico #2, y se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9982 y de 0.9983 respectivamente. Haciendo una comparación de ambos modelos se puede apreciar que la aplicación de estos para determinar la linealidad del sistema, no demuestran diferencias significativas en los valores del coeficiente de determinación, por tal razón la aplicación de cualquiera de los dos modelos para determinar este parámetro es aceptable, según el criterio de aceptación previamente establecido, siendo este ≥ 0.995 .



2. PRECISIÓN.

2.1. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

Tabla No. 2. Lecturas obtenidas para evaluación de Repetibilidad del Método.

Concentración Nominal Muestra 6 mg/L	ABSORBANCIAS		
	DIA 1		PROMEDIO
	0.08395	0.0855	0.084725
	0.08675	0.0852	0.085975
	0.0844	0.0851	0.08475
	0.08365	0.0849	0.084275
	0.085	0.08555	0.085275
	0.0831	0.08335	0.083225
	0.08375	0.08515	0.08445
	0.08305	0.0857	0.084375
0.0847	0.08535	0.085025	
0.0844	0.0848	0.0846	
RESULTADOS ESTADÍSTICOS			
PROMEDIO GLOBAL		0.0846675	
DESV. EST. DE REPETIBILIDAD (S_r)		0.00071405	
%RSD_r		0.8434	

Análisis:

En la tabla #2 se reflejan los resultados para la determinación de la precisión del método, en condiciones de repetibilidad, donde el porcentaje de desviación estándar relativa encontrado es de 0.8434%, tomando en cuenta el criterio de aceptación, el cual la %RSD de repetibilidad debe ser $\leq 2\%$, esto demuestra que el método presenta buena repetibilidad.



2.2. PRECISIÓN INTERMEDIA DEL SISTEMA.

Tabla No. 3. Lecturas obtenidas para evaluación de Precisión Intermedia del sistema.

	ABSORBANCIAS		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
Concentración Nominal Estándar 6 mg/L	0.084	0.0857	0.0818
	0.086	0.0847	0.0805
	0.0845	0.0836	0.0822
	0.0829	0.0836	0.082
	0.0831	0.0837	0.0829
	0.0823	0.0829	0.0831
	0.0827	0.0843	0.0838
	0.0828	0.0847	0.0824
	0.0847	0.0855	0.0815
	0.0854	0.0856	0.081
	0.0839	0.0853	0.0855
	0.0875	0.0857	0.0849
	0.0843	0.0866	0.0859
	0.0844	0.0862	0.0854
	0.0869	0.0874	0.0838
	0.0839	0.0838	0.0838
	0.0848	0.086	0.0845
	0.0833	0.0867	0.0842
	0.0847	0.0852	0.0833
	0.0834	0.084	0.0844
PROMEDIO	0.0834	0.084	0.0844
RESULTADOS ESTADÍSTICOS			
DESV. EST. DE REPETIBILIDAD (S_r)			0.001536656
VARIANZA DE REPETIBILIDAD			2.36131×10^{-06}
VARIANZA DEL FACTOR DIA (S^2_D)			1.70121×10^{-07}
DESV. EST. DE REPRODUCIBILIDAD (S_R)			0.002



Análisis:

En la tabla #3 se muestran los resultados correspondientes a precisión intermedia del sistema, donde el porcentaje de desviación estándar de reproducibilidad o precisión intermedia es de 0.002%, tomando en cuenta el criterio de aceptación, en donde el %RSD de reproducibilidad debe ser $\leq 2\%$. Esto refleja que no existen diferencias significativas en la solución estándar analizada entre los diferentes días, por tanto se puede decir que el instrumento da resultados precisos.



2.3. PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO.

Tabla No. 4. Lecturas obtenidas para evaluación de Precisión Intermedia del método.

Concentración Nominal Muestra 6 mg/L	ABSORBANCIAS		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	0.0879	0.0812	0.0804
	0.0886	0.0811	0.0796
	0.0884	0.0819	0.0811
	0.088	0.0825	0.0813
	0.0885	0.0803	0.0845
	0.0868	0.0822	0.0817
	0.0866	0.0787	0.0834
	0.0881	0.0788	0.0802
	0.0859	0.0817	0.082
	0.0887	0.0803	0.0823
PROMEDIO	0.08775	0.08087	0.08165
RESULTADOS ESTADÍSTICOS			
DESV. EST.	0.00336469		
DESV. EST. DE REPETIBILIDAD (S_r)	1.13212x10 ⁻⁰⁵		
VARIANZA DEL FACTOR DIA (S²_D)	0.00012573		
DESV. EST. DE REPRODUCIBILIDAD (S_R)	0.01170689		

Análisis:

En la tabla #4 se reflejan los resultados correspondientes a precisión intermedia del método, donde el porcentaje de desviación estándar de reproducibilidad o precisión intermedia es de 0.0117%, tomando en cuenta el criterio de aceptación, en donde el %RSD de reproducibilidad debe ser $\leq 2\%$. Esto refleja que no existen diferencias significativas en la muestra analizada entre los diferentes días, por tanto se puede decir que la cuantificación de hierro utilizando este instrumento da resultados precisos

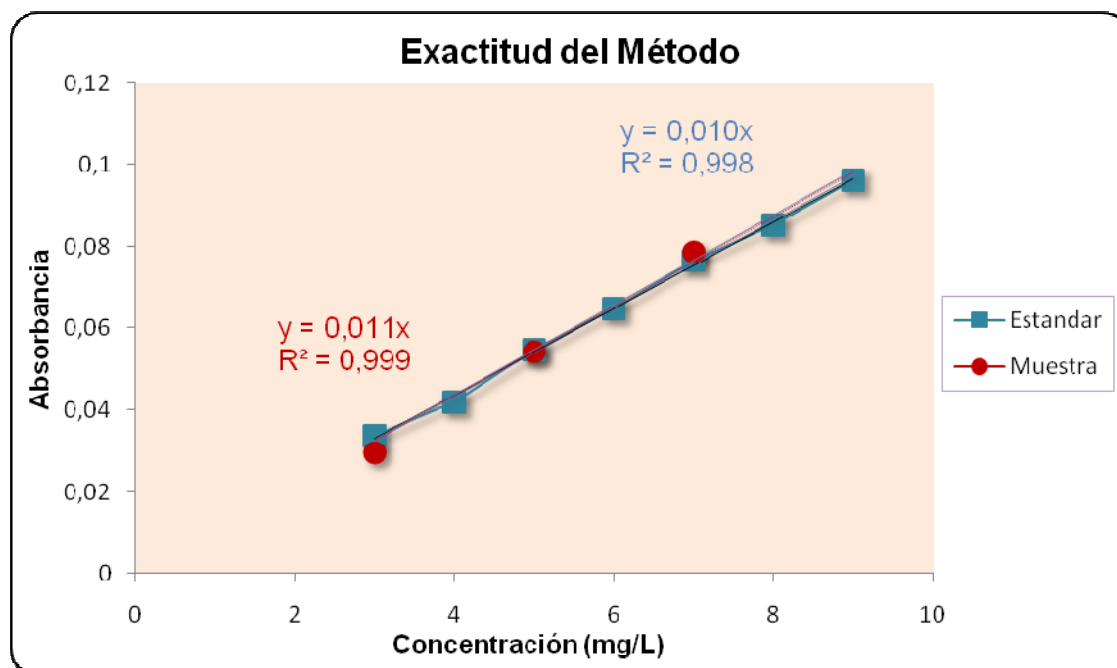


3. EXACTITUD DEL MÉTODO.

Tabla No. 5. Lecturas obtenidas del estándar y la muestra a determinadas concentraciones para la Exactitud del método.

Concentración (mg/L)	ABSORBANCIAS	
	Estándar	Muestra
3	0.0338	0.0301
4	0.0421	
5	0.0548	0.0542
6	0.0650	
7	0.0768	0.0786
8	0.0854	
9	0.0965	
Promedio	0.0649	0.0543
RESULTADOS ESTADÍSTICOS		
Coeficiente de Determinación (r^2) del Estándar.		0.99823108
Coeficiente de Determinación (r^2) de la Muestra.		0.99999114
% Recuperado.		100.176318

Gráfico No. 3. Análisis Gráfico de la Exactitud del Método por comparación de curvas de calibración de la muestra y estándar.





Análisis:

En la gráfica #3 se refleja la curva de calibración de la muestra y el estándar respectivamente, construida a partir de los resultados obtenidos en la tabla #5 de lecturas de la muestra y el estándar a determinadas concentraciones. La extrapolación de estas dos curvas dan como resultado un valor del coeficiente de determinación de 0.999, al relacionar el coeficiente de determinación de la muestra y el estándar multiplicándolo por 100 se obtiene un porcentaje de recobro del 100.176%, por tanto cumple con el criterio de aceptación que debe estar entre 98% y 102%, demostrando que la matriz en la que se encuentra la tableta no ejerce un efecto depresor o intensificador sobre el analito.



4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Tabla No. 6. Datos obtenidos para evaluación del Límite de Detección y Cuantificación.

Concentración (mg/L)	ABSORBANCIA
3	0.018414286
4	0.024428571
5	0.030757143
6	0.037071429
7	0.043914286
8	0.048728571
9	0.053871429
RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
PENDIENTE (b_1)	0.006004592
VARIANZA DE LOS RESIDUALES ($S^2_{x/y}$)	6.11529×10^{-07}
DESV. EST. DE LOS RESIDUALES ($S_{x/y}$)	0.000782003
LÍMITE DE DETECCIÓN	0.428470435
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	1.302341748

Análisis:

En la tabla #6 se reflejan los valores de absorbancia para determinar el límite de detección y cuantificación, siendo estos de 0.4 mg/L y 1.3 mg/L respectivamente, lo que demuestra la cantidad de analito que debe estar presente en la muestra para que pueda ser detectado y cuantificado a la longitud de onda correspondiente ($\lambda = 248.3$ nm).



ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE.

1. MODELO MATEMÁTICO.

$$\%M = \frac{Am * Wm * V2m * V2s * P}{As * Ws * Vs * Vm * V3m} * 100 \quad (\text{Ec. 22})$$

2. INCERTIDUMBRES ESTÁNDARES.

Tabla No. 7. Identificación de las fuentes atribuibles al mesurando con sus respectivas incertidumbres.

Variables	Componentes	Valores
$uAm = 0.652$	Incertidumbre Muestra (u_{mst})	0.00549793
	Incertidumbre Blanco (u_b)	
$uWm = 100$	Incertidumbre Balanza (u_w)	0.100000355
$uV2m = 0.6$	Incertidumbre Micropipeta 1mL (u_{v1mL})	0.001224745
$uV2s = 100$	Incertidumbre Balón de 100mL (u_{v100mL})	0.06325
$uP = 97$	Incertidumbre Pureza del patrón (u_p)	0.03
$uAs = 0.6498$	Incertidumbre Estándar (u_{std})	0.000239263
	Incertidumbre Blanco (u_b)	
$uWs = 1.002$	Incertidumbre Concentración patrón ($u_{[p]}$)	0.005
$uVs = 0.6$	Incertidumbre Micropipeta 1mL (u_{v1mL})	0.06325
$uVm = 100$	Incertidumbre Balón de 100mL (u_{v100mL})	0.001224745
$uV3m = 100$	Incertidumbre Balón de 100mL (u_{v100mL})	0.06325



3. COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD.

Tabla. No. 8. Determinación de los Coeficientes de Sensibilidad con sus respectivos valores.

Variable	Fórmula	Valor
uAm	$\frac{Wm V2m V2s P}{As Ws Vs Vm V3m}$	148.9787430
uWm	$\frac{Am V2m V2s P}{As Ws Vs Vm V3m}$	0.9713414045
$uV2m$	$\frac{Am Wm V2s P}{As Ws Vs Vm V3m}$	161.8902341
$uV2s$	$\frac{Am Wm V2m P}{As Ws Vs Vm V3m}$	0.9713414045
uP	$\frac{Am Wm V2m V2s}{As Ws Vs Vm V3m}$	1.001382891
uAs	$-\frac{Am Wm V2m V2s P}{As^2 Ws Vs Vm V3m}$	-149.4831340
uWs	$-\frac{Am Wm V2m V2s P}{As Ws^2 Vs Vm V3m}$	-96.94025993
uVs	$-\frac{Am Wm V2m V2s P}{As Ws Vs^2 Vm V3m}$	-161.8902341
uVm	$-\frac{Am Wm V2m V2s P}{As Ws Vs Vm^2 V3m}$	-0.9713414045
$uV3m$	$-\frac{Am Wm V2m V2s P}{As Ws Vs Vm V3m^2}$	-0.9713414045



4. FÓRMULA INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR COMBINADA (ucM).

ucM

$$\begin{aligned} &:= \left(cAm^2 \cdot uAm^2 + cWm^2 \cdot uWm^2 + cV2m^2 \cdot uV2m^2 + cV2s^2 \right. \\ &\cdot uV2s^2 + cP^2 \cdot uP^2 + cAs^2 \cdot uAs^2 + cWs^2 \cdot uWs^2 + cVs^2 \cdot uVs^2 \\ &\left. + cVm^2 \cdot uVm^2 + cV3m^2 \cdot uV3m^2 \right)^{1/2} \quad (\text{Ec. 23}) \end{aligned}$$

Análisis:

Para la estimación de la incertidumbre fue necesario encontrar las variables o fuentes que influyen en la respuesta del mesurando, tal como se puede observar en la tabla #7, para luego implementar el modelo matemático (Ec. 22) adecuado que refleje la relación entre el mesurando y las variables. A partir de ello, se calculó las incertidumbres y los coeficientes de sensibilidad para determinada variable, a como se reflejan en la tabla #7 y #8 respectivamente. Una vez calculado las incertidumbres y los coeficientes de sensibilidad, se estimó la Incertidumbre Combinada (ucM) aplicándose la ecuación #23, obteniéndose un valor de 1.0036. Finalmente se estimó la Incertidumbre Expandida (U_e) multiplicando el valor de la incertidumbre combinada por el factor de cobertura ($k=2$), dando un valor de 2.0073, para un nivel de confianza del 95.5%, el cual se atribuye al mesurando. Esto quiere decir que el valor obtenido experimentalmente en la cuantificación de hierro elemental por espectrofotometría de absorción atómica tendrá un $\pm 2.0073\%$.



CONCLUSIONES



De acuerdo a los resultados obtenidos en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León, se puede afirmar que esta metodología analítica es aplicable en la cuantificación de hierro elemental en las distintas presentaciones de tabletas de sulfato ferroso en concentraciones comprendidas entre 125 y 525 mg.

La metodología implementada en el estudio, aplicando ciertos parámetros de la validación como linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y estimación de incertidumbre, demuestran que el resultado obtenido 100.17 ± 2.0073 , en la cuantificación de hierro elemental es preciso, exacto y a un nivel de confianza del 95.5%.

Los parámetros de validación efectuados en la cuantificación de hierro elemental cumplen con los criterios de aceptación previamente establecidos en la metodología analítica estudiada, siendo esta lineal en el intervalo de concentración analizada, demostrada mediante el coeficiente de determinación (r^2), aplicando el modelo que más se ajuste al método de análisis. En la precisión, la metodología demostró que los datos obtenidos no presentan diferencias significativas entre ellos durante el día y entre los días, con lo que se concluye que la metodología es precisa. La exactitud del método realizada mediante la comparación de los coeficientes de determinación (r^2) de la curva de calibración del estándar y la muestra respectivamente, demostró no tener ningún efecto matriz sobre el analito, por lo tanto la metodología es exacta.

En la estimación de la incertidumbre del método analítico descrito para la cuantificación de hierro elemental, los factores o fuentes que se asocian de manera normal en la respuesta del analito son: efecto instrumental, efectos del operador, balón, micropipeta, pureza de reactivo y patrón. Estas fuentes generan una incertidumbre expandida del 2.0073, la cual se le atribuyó al mesurando una vez calculado su concentración.



RECOMENDACIONES



- Aplicar las buenas prácticas de laboratorio y de medición.
- Emplear materiales de referencia certificados y conservarlo de acuerdo a las condiciones de temperatura recomendadas en el certificado.
- Siempre que sea posible y práctico, se deberá utilizar un método de análisis cuyas características de rendimiento sean previamente establecidas, mediante estudios investigativos o ensayos que se encuentren en algunas revistas o referencias farmacopeicas.
- Se deberá seleccionar las características o parámetros de validación que garanticen que los resultados obtenidos en la cuantificación del analito en estudio, sean seguros, exactos y con un nivel de confiabilidad estimado mediante el cálculo de la incertidumbre.
- Garantizar el buen funcionamiento del equipo, así como las condiciones en las que se trabajará el método analítico, de modo que durante el desarrollo de la cuantificación del analito no exista ningún inconveniente que retrase el estudio investigativo.
- Llevar a cabo un Control de Calidad Interno que alerte acerca de las desviaciones, respecto a las especificaciones de calidad analítica que puedan generarse durante la aplicación del método en un ensayo de rutina.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. “Validación de Métodos Analíticos”. España, 2001. Págs. 23-25, 34, 56-96.
2. Skoog, Douglas; Holler, James; Nieman, Timothy. “Principios de Análisis Instrumental”. Quinta Edición, 2001. Editorial McGraw Hill/Interamericana, España. Págs. 163,165-168,173, 177-181, 188, 189, 219-237.
3. Rubinson, Kenneth; Rubinson, Judith. “Análisis Instrumental”. Primera Edición, 2001. Editorial Prentice Hall, Madrid, España. Págs. 377-380, 383-390, 392-398.
4. Harris, Daniel. “Análisis Químico Cuantitativo”. Tercera Edición Español, 2007. Editorial Reverté, España. Págs. 408-415, 418-426, 495-499, 509, 510.
5. EURACHEM/CITAC Guía. “Cuantificación de la Incertidumbre en las Mediciones Analíticas”. Editores: SLR Ellison, M. Rösslein, A. Williams. Segunda Edición. Págs. 9-13, 21-57.
6. Compañó, Ramón; Ríos, Ángel. “Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos”. Editorial Síntesis. Madrid, España. Págs. 217-234, 236-237, 241-243.
7. Rubinson, Kenneth; Rubinson, Judith. “Química Analítica Contemporánea”. Primera Edición, 2000. Editorial Prentice Hall, México. Págs. 318, 326, 330, 342-350.
8. Harvey, David. “Química Analítica Moderna”. Primera Edición Español, 2002. Editorial McGraw Hill/Interamericana, Colombia. Págs. 368-381, 412-420.
9. Miller, James; Miller, Jane. “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”. Cuarta Edición, 2002. Editorial Prentice Hall, España. Págs. 100-104, 125-130.
10. ICH-Q2A. Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures. Marzo, 1995. Págs. 1-4.
11. ICH-Q2B. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. November, 1996. Págs. 2-10.
12. Gutiérrez, Humberto. “Calidad Total y Productividad”. Segunda Edición, 2005. Editorial McGraw Hill/Interamericana, México. Págs. 165, 166, 170-175.



13. Skoog, Douglas; West, Donald; *et al.* “Fundamentos de Química Analítica”. Octava Edición, 2005. Editorial Thompson, México. Págs. 720-725, 727-729, 733-755, 743-746, 760-762, 770-774, 779, 852-866, 870-877.
14. http://www.panalimentos.org/rilaa/Cursos/EspectroAbsAtomica_29092009/OnDemandClase2.asp. “Seminario de Espectrofotometría de Absorción Atómica y Validación del Método”. Expositores: Q.B.P. Marcos Loredo Tovías y M. en C. María Elena García Arreola. Origen de transmisión: Laboratorio de Espectrofotometría de Masas, Instituto de Geología, UASLP, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de Septiembre de 2009.
15. United States Pharmacopeia/ The National Formulary, 2007: USP XXX/ NF 25. Págs. 2129, 2130.
16. United States Pharmacopeia/ The National Formulary, 2006: USP XXIX/ NF 24. Págs. 1035.
17. British Pharmacopoeia 2009. Londres, Inglaterra. Págs. 278.
18. http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-711.02-159.pdf. “Procedimiento para determinar hierro en premix vitamínicos en uso alimentos”, Método Espectrofotometría de Absorción Atómica/ Llama. Gobierno de Chile, Instituto de Salud Pública.
19. Gennaro, Alfonso R./ dirigido por. “Remington Farmacia”. Vigésima Edición, 2003. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Págs. 1494, 1495, 1496.
20. “Procedimiento para la calibración y control de calidad de los instrumentos de espectroscopía atómica”. Instituto de Nacional de Normalización, INN-Chile. Primera Edición, 2001.
21. Martínez, M^a Macarena. “Validación de la Metodología Analítica para la Cuantificación de sodio y potasio por fometría de llama, en soluciones parenterales de gran volumen”. Universidad de Chile. Lab. B.Braun Medical, Diciembre 2004.
22. Seijas Martínez, M^a Victoria. “Determinación de selenio en suero por espectrofotometría de absorción atómica”. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Junio 1992.



ANEXOS

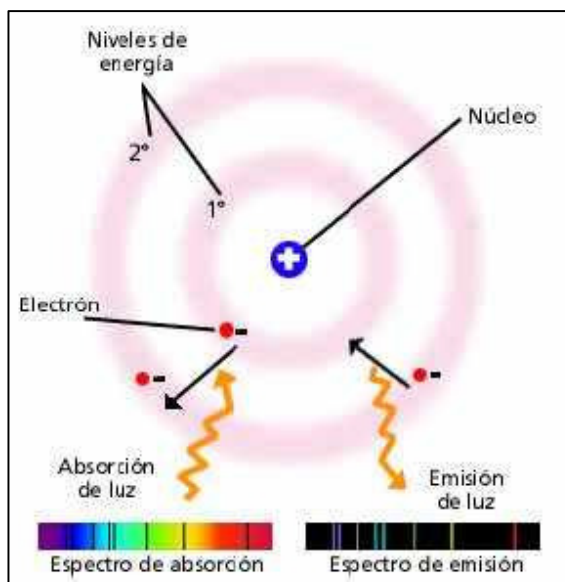


Figura 1. Transformaciones de energía de un átomo.

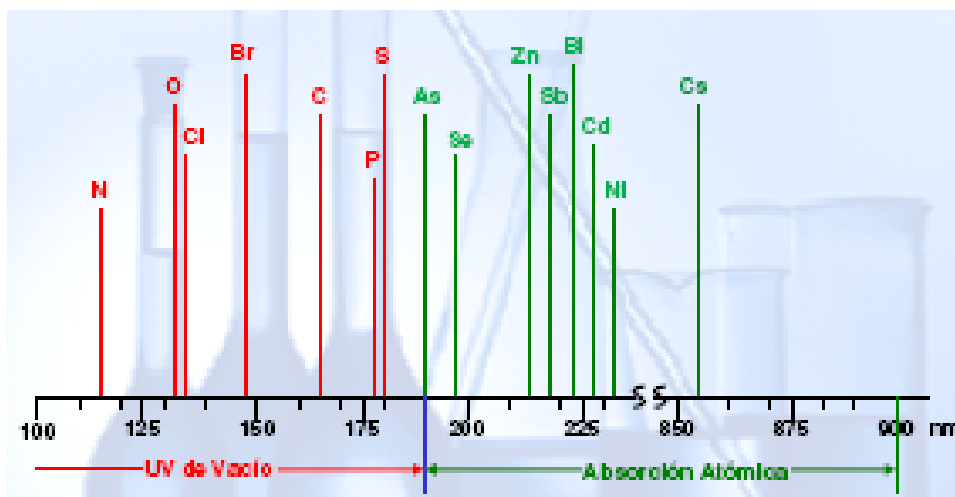


Figura 2. Intervalo de longitudes de onda para trabajar en Absorción Atómica.

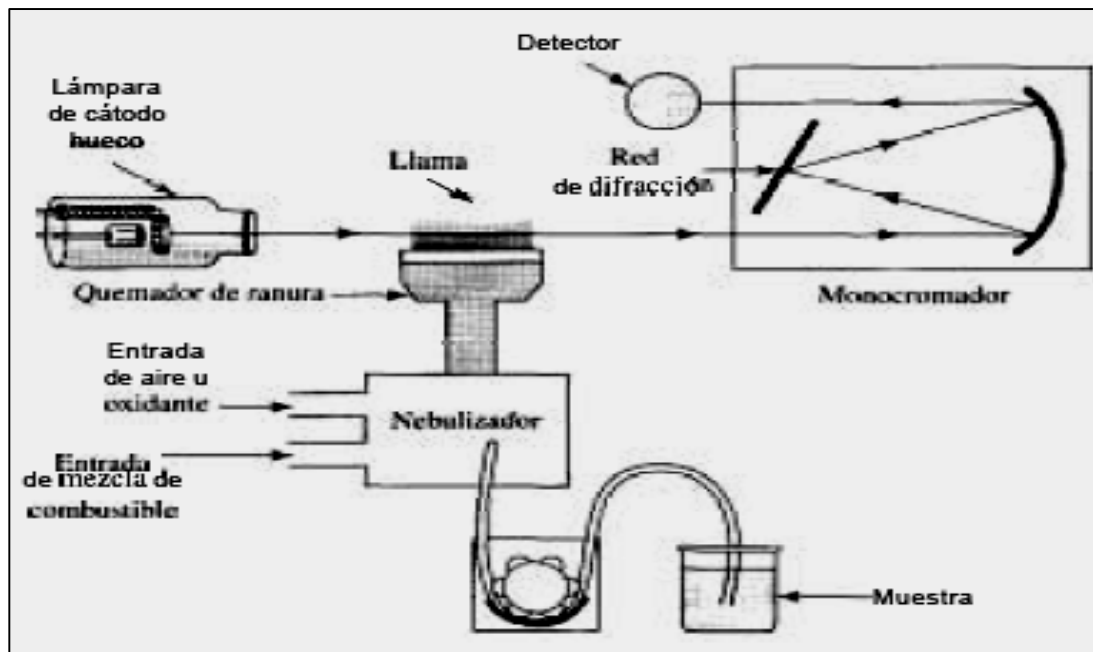


Figura 3. Principales componentes del Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

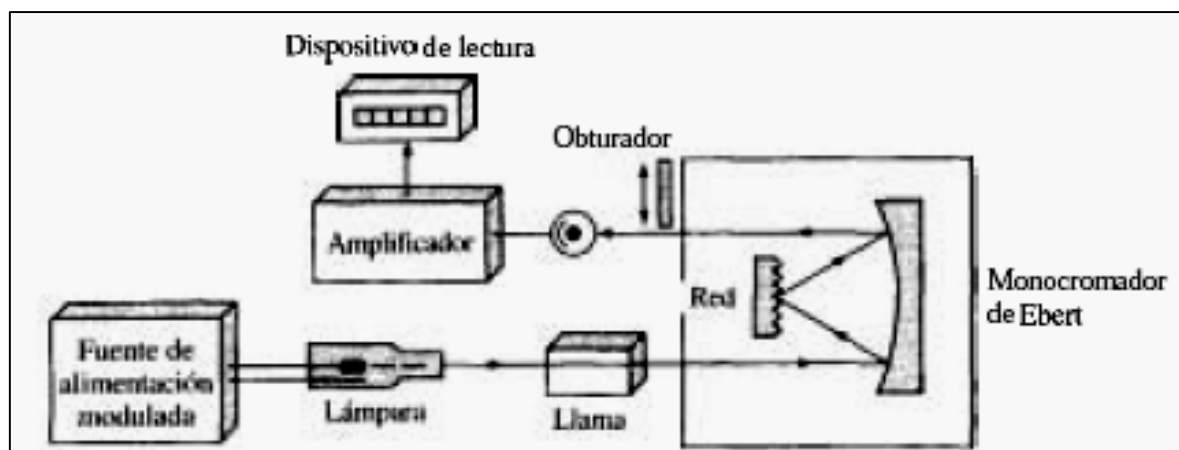


Figura 4. Espectrofotómetro de Haz sencillo.

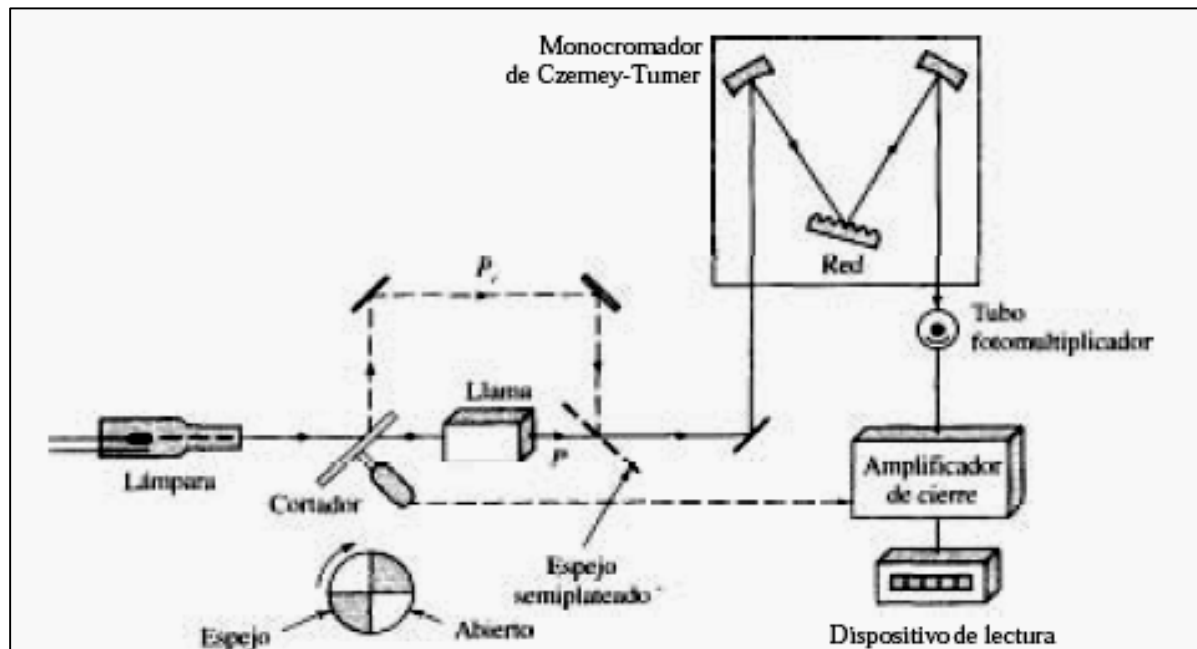


Figura 5. Espectrofotómetro de Doble Haz.

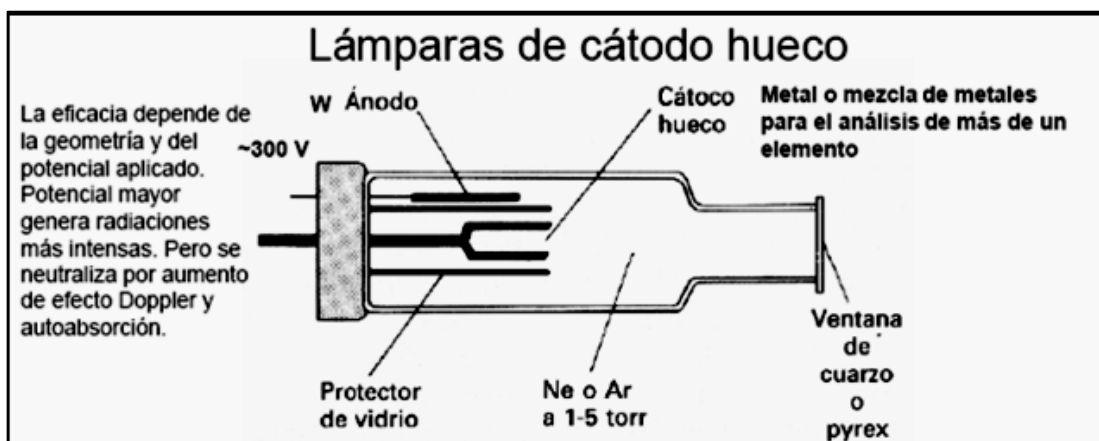


Figura 6. Diagrama de una lámpara de cátodo hueco.

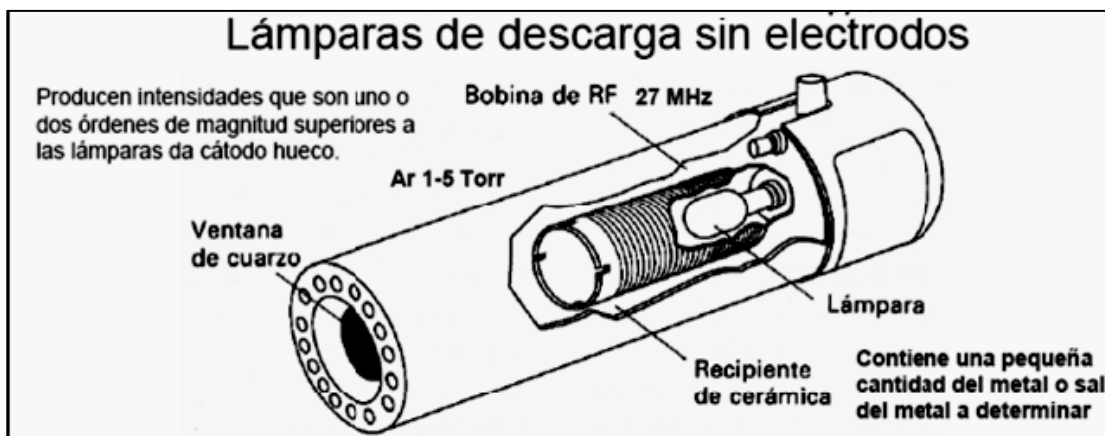


Figura 7. Diagrama de una lámpara de cátodo hueco.

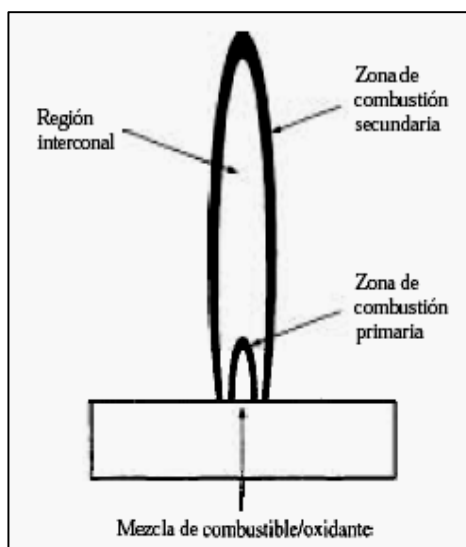


Figura 8. Regiones de una llama.

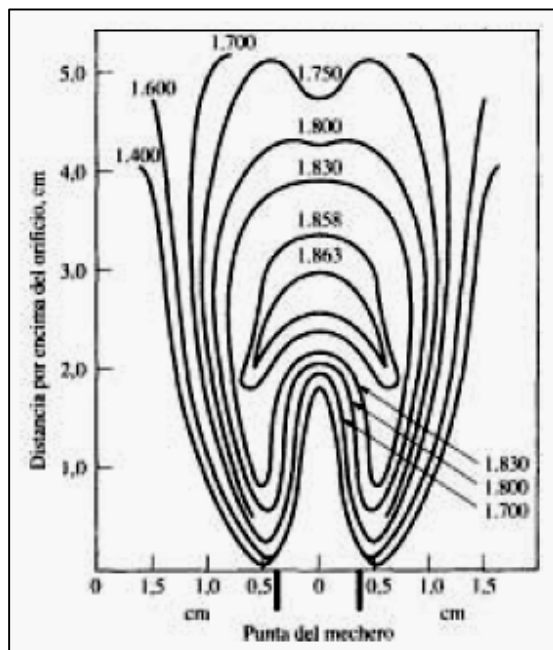


Figura 9. Perfiles de temperatura en °C en una llama de gas natural/aire.

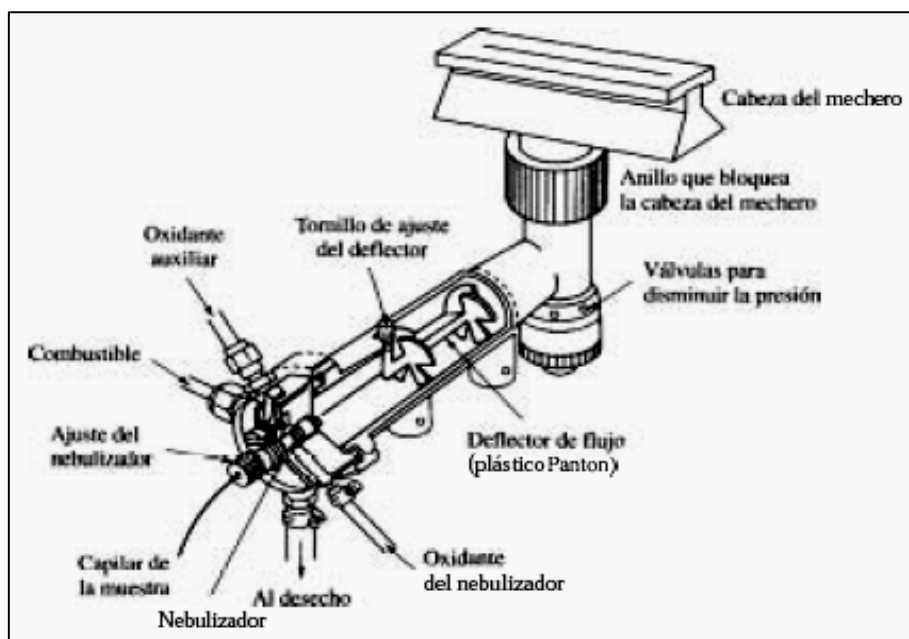


Figura 10. Mechero de flujo laminar.

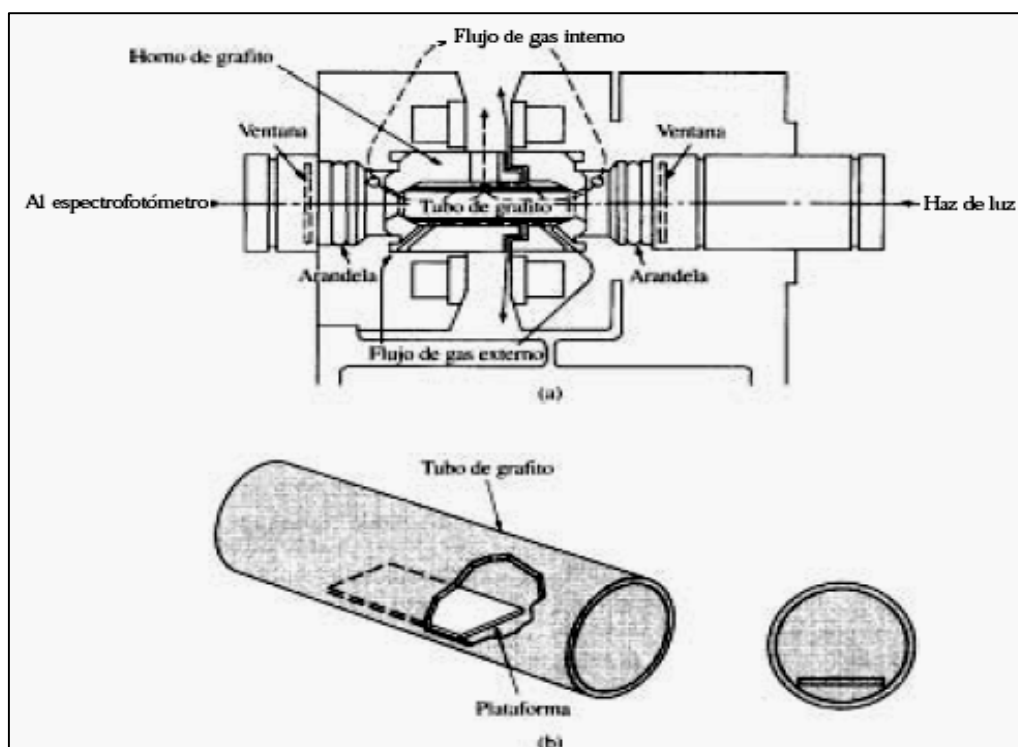


Figura 11. Sección transversal de un horno de grafito y Plataforma de L'vov.

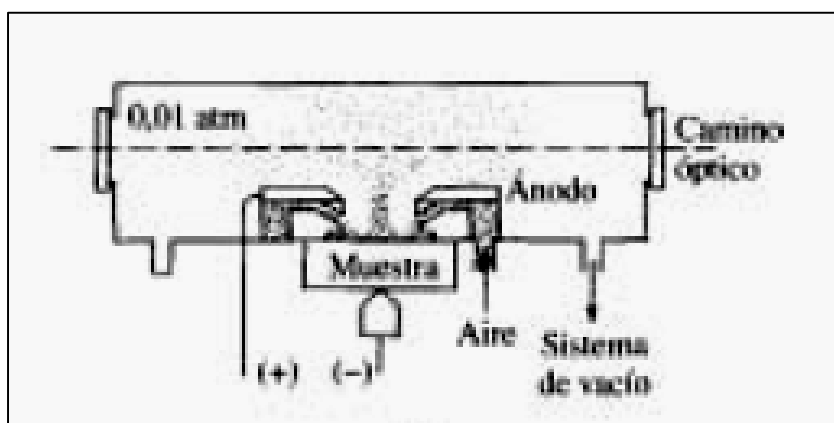


Figura 12. Sección transversal de una celda para atomización de muestras sólidas por descarga luminiscente.

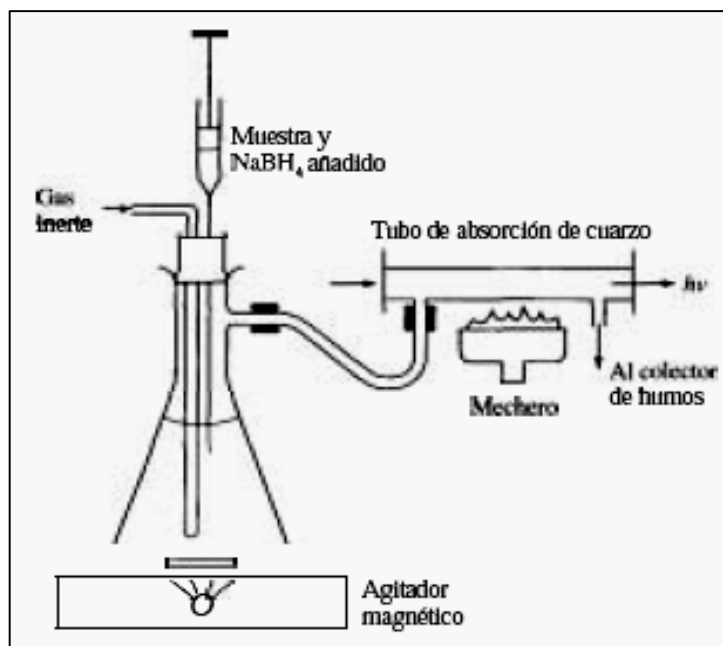


Figura 13. Sistema de generación de hidruros.

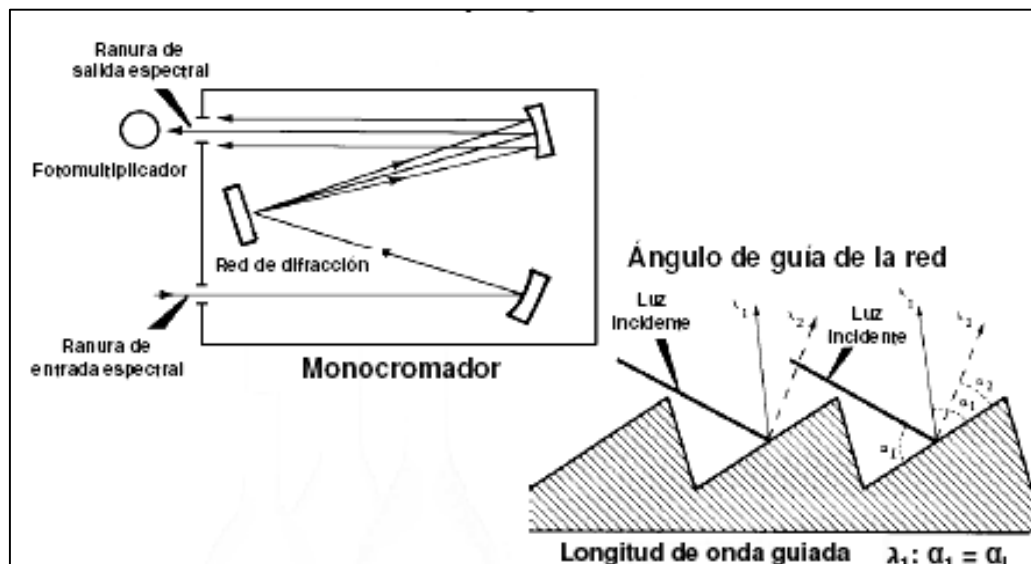


Figura 14. Monocromador y rejilla de difracción.

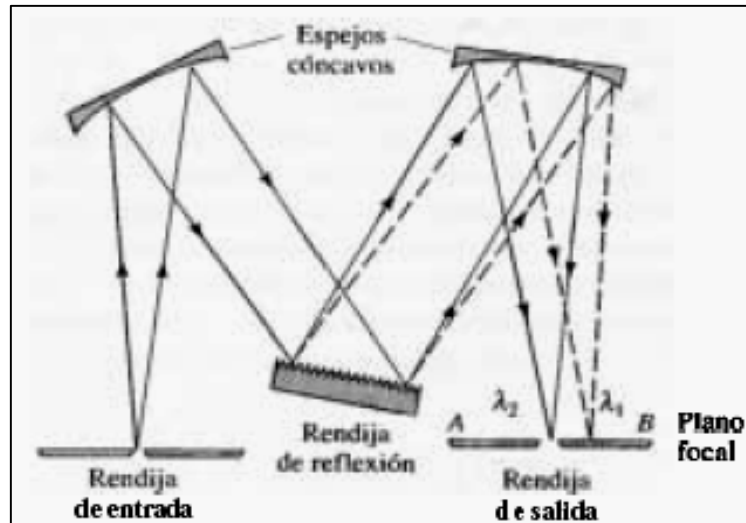


Figura 15. Componente de un monocromador.

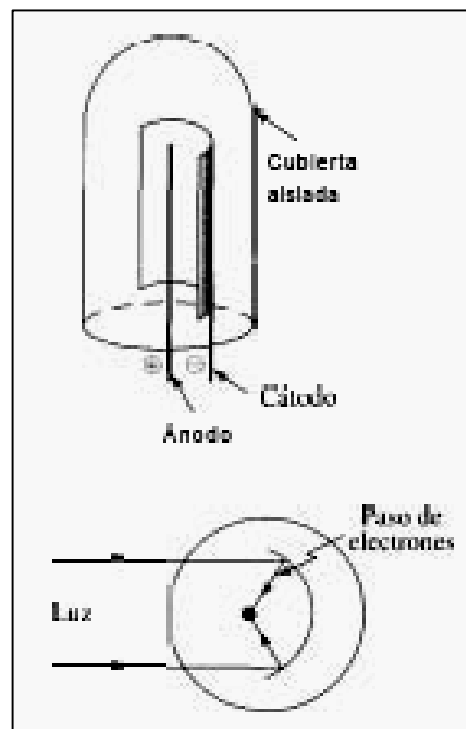


Figura 16. Construcción de un Fototubo.



Figura 17. Espectrofotómetro de Absorción Atómica VARIAN AA240.



Figura 18. Lámparas de Cátodo Hueco del Espectrofotómetro de Absorción Atómica VARIAN AA240.

Figura 19. El Proceso de Estimación de la Incertidumbre.

Cuantificación de hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso aplicando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, durante el año 2010.

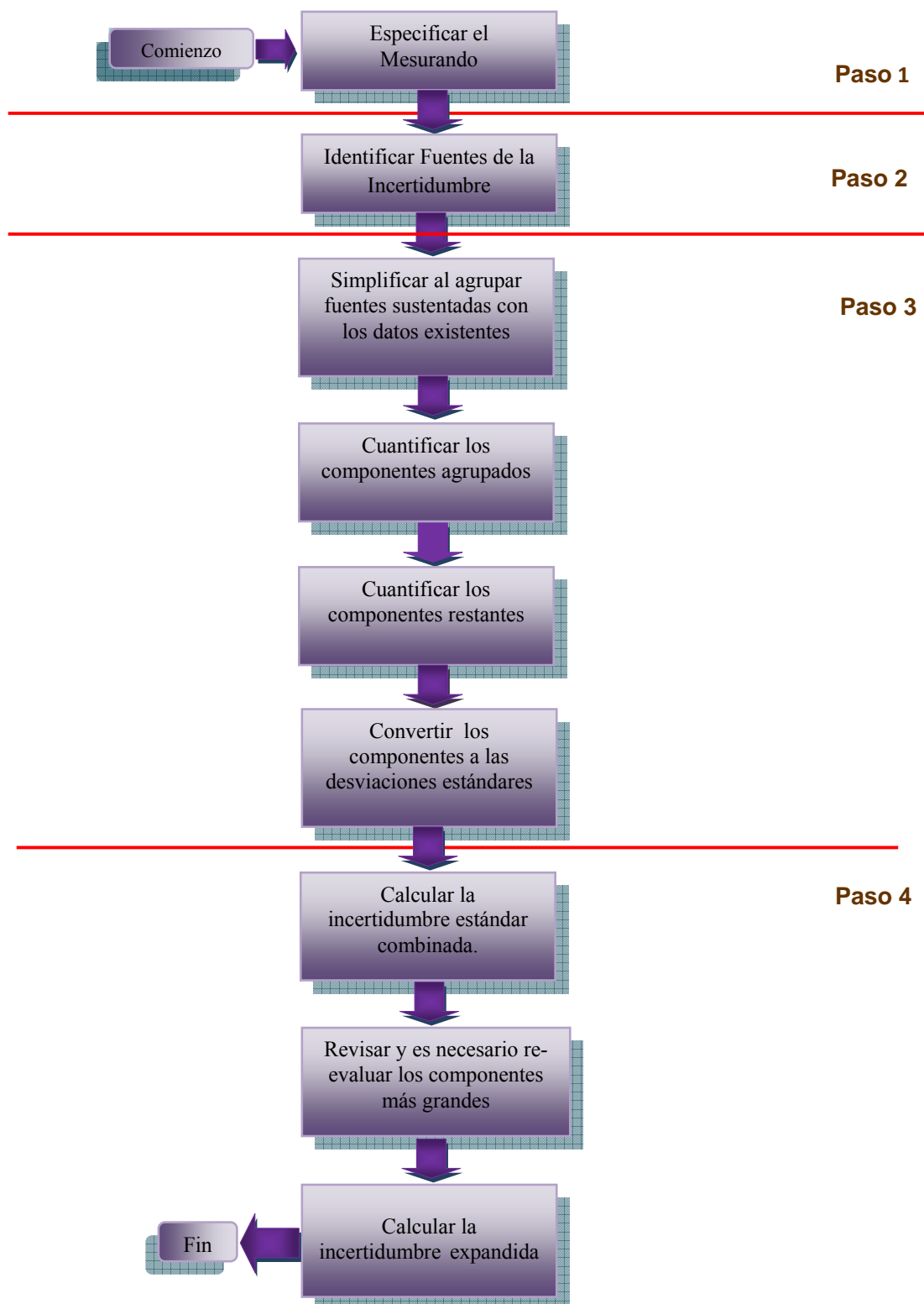




Tabla No. 9. Reporte de datos para método de cuantificación de hierro elemental en tabletas de sulfato ferroso por espectrofotometría de absorción atómica.

Instrumento:		Espectrofotómetro de Absorción Atómica VARIAN AA 240			
Parámetros de operación					
Elemento	LCH	Ancho Rendija	Longitud de Onda	Flujo Combustión Aire-C₂H₂	Flujo Nebulizador
Fe ⁰	5.0 mA	0.2 nm	248.3 nm	3.5-1.5 L/min	4-5 mL/min
Parámetros de validación					
	Parámetro	Resultado	Criterio de Aceptación		
Linealidad	r ²	0.9982	≥ 0.995	Cumple	
Rango		3-9 mg/L			
Repetibilidad	%RSD	0.8434	≤ 2%	Cumple	
Precisión Intermedia	%RSD	0.0117	≤ 2%	Cumple	
Exactitud	%R	100.17	98 ≤ %R ≤ 102%	Cumple	
LD		0.4 mg/L			
LC		1.3 mg/L			
Incertidumbre	U _e	± 2.0073			



Gráfico No. 4. Análisis Gráfico de Residuales para Cuantificación de Hierro Elemental.

