

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



“DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DEL HIERRO EN ALGUNAS LEGUMINOSAS ANTES Y DESPUÉS DE SU TRATAMIENTO TÉRMICO USANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE UV-VISIBLE PREVIA COMPLEJACIÓN DE HIERRO CON O-FENANTROLINA”.



**MONOGRAFÍA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADAS EN QUÍMICA**

**PRESENTADAS POR
BR. LIZBETH DEL SOCORRO GONZALEZ CARRIÓN
BR. JANNYN DEL LYMA HERNÁNDEZ VALDIVIA**

**TUTOR
DR. SERGIO LÓPEZ GRÍO**

2012: AÑO DEL BICENTENARIO

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro Señor por darnos la fortaleza y la sabiduría para concluir con éxitos nuestros estudios universitarios.

A nuestras queridas familias por brindarnos siempre su inmenso soporte y su infinito amor, por la comprensión en el cansancio y nuestro mal humor en los desvelos, por las largas horas de ausencia comprendida de nuestro esfuerzo por culminar nuestra carrera.

A nuestro tutor Sergio López Grío por haber aceptado el reto de guiarnos al desarrollo de nuestro trabajo, demostrando su paciencia y preocupación con nosotros.

A nuestros maestros, por siempre apoyarnos en el camino de nuestra formación y compartir sus valiosos conocimientos.

INDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN	1
II. OBJETIVOS	2
III. MARCO TEÓRICO	3
III.1 Frijoles	3
III.1.1 Descripción	3
III. 1.2 Propiedades	4
III.2 Hierro	5
III.2.1 Características	6
III.2.2Aplicaciones	7
III.2.3 Obtención	7
III.2.4 Compuestos	9
III.2.5Metabolismo	10
III.2.6Isotopos	11
III.2.7 Precauciones	11
III.2.8 Clasificación	12
III.2.9Funciones	13
III.2.10Fuentes Naturales	15
III.2.11Deficiencia de Hierro	16
III.2.12 Factores que Afectan la Absorción del Hierro	16
III.2.13 Factores que Favorecen la Absorción del Hierro	17

ÍNDICE DE CONTENIDOS

III.2.14 Factores que Reducen la Absorción del Hierro	17
III.2.15 Anemia por Deficiencia de Hierro	18
III.2.15.1 Síntomas	19
III.2.16 ¿Quiénes necesitan dosis extras de Hierro para prevenir su Deficiencia?... 19	
III.2.17 Dosis recomendada de Hierro	20
III.2.18 Toxicidad	21
III.2.19 El Hierro en el Organismo	23
III.3 Técnicas de Análisis del Hierro	23
III.3.1 Método Colorimétrico (Fenantrolina)	23
III.3.2 Método Espectrofotométrico de Absorción Atómica	24
III.3.3 Método de Plasma de Acoplamiento Inductivos	25
III.4 Límite de Detección del Hierro en las Técnicas	26
III.5 Espectrofotometría de Ultravioleta Visible (UV- Vis)	26
III.6 Parámetros de Validación en Métodos de Análisis Cuantitativos	28
III.6.1 Precisión.....	28
III.6.2 Repetibilidad.....	28
III.6.3 Precisión Intermedia.....	29
III.6.4 Reproducibilidad.....	29
III.6.5 Exactitud.....	29
III.6.6 Especificidad / Selectividad	30
III.6.7 Linealidad	30
III.6.8 Rango.....	30

ÍNDICE DE CONTENIDOS

III.6.9 Límite de Detección.....	31
III.6.10 Límite de Cuantificación	31
III.6.11 Inercia.....	31
III.6.12 Incertidumbre	32
III.7 Tratamientos de los Datos.....	32
III.7.1 Prueba de Bartlett	33
III.7.2 ANOVA de un Factor.....	34
III.7.3 Comparación de Dos Varianzas Muestrales	36
III.7.4 Comparación de Dos Medias	37
III.7.4.1 Medias Muestrales Homogéneas	37
III.7.4.2 Medias Muestrales Heterogéneas.....	38
IV.MATERIALES Y MÉTODOS	39
IV.1 Equipos.....	39
IV.2Materiales	39
IV.3 Reactivos	39
IV.4 Soluciones	40
IV.4.1 Solución “Madre” de Hierro	40
IV.4.2 Solución “Estándar” de Hierro.....	40
IV.4.3 Solución de Hidroxilamina.....	40
IV.4.4 Solución Tampón de Acetato	40
IV.4.5 Solución de O-Fenantrolina	40
IV.5 Metodología	41

ÍNDICE DE CONTENIDOS

IV.5.1 Determinación de Hierro	41
IV.5.1.1 Estándares	41
IV.5.1.2 Muestras	42
V. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	43
V.1 Selección de las Muestras de Estudio	43
V.2 Determinación de los Parámetros Experimentales del Método.....	44
V.2.1 Rango Lineal.....	45
V.2.2 Linealidad del Método.....	46
V.2.2.1 Prueba de Correlación	46
V.2.2.2 Prueba de Falta de Ajuste.....	47
V.2.2.3 Porcentaje de Linealidad.....	49
V.2.2.4 Análisis de Varianza de ANOVA	50
V.2.2.5 Coeficiente de Determinación	51
V.2.2.6 Gráficos de Residuales	52
V.2.2.7 Control de Calidad de la Recta de Calibración	54
V.2.3 Estudio del Efecto Matriz	55
V.2.3.1 Comparación de las Pendientes de la Rectas de Adición Patrón respecto a la Pendiente de la Curva de Calibración Normal.....	56
V.2.3.2 Comparación Estadísticas de las Pendientes de la Recta de Adición Patrón y Calibración Normal.....	58
V.2.4 Repetibilidad y Reproducibilidad.....	59
V.2.4.1 Repetibilidad y Reproducibilidad Instrumental	59
V.2.4.2 Repetibilidad y Reproducibilidad del Método	65

ÍNDICE DE CONTENIDOS

V.2.5 Exactitud	71
V.2.5.1 Porcentaje de Recuperación calculado a partir de las Muestras Fortificadas	71
V.2.5.2 Porcentaje de Recuperación calculado a partir de las Rectas de Calibración por Adición Patrón y Calibración Normal.....	73
V.2.6 Limite de Detección y Límite de Cuantificación	74
V.2.7 Incertidumbre de los Resultados.....	76
V.3 Determinación del contenido de Hierro antes y después de su tratamiento térmico	78
V.3.1 Comparación Porcentual de la Muestras	79
V.3.2 Comparación Estadísticas de las Muestras	80
V.3.2.1 Comparación de Muestras de Frijoles Crudos	81
V.3.2.2 Comparación de Muestras de frijoles Cocidos y Agua de Extracción	84
V.4 Relación entre el contenido de Hierro encontrado entre las muestras con la dosis diaria recomendada (DDR).....	85
VI.CONCLUSIÓN	90
VII. BIBLIOGRAFÍA	92

I. RESUMEN

Los frijoles o judías son un tipo de vegetales de la familia de las leguminosas, ampliamente conocidos por su alto contenido de hierro. En Nicaragua se cultivan diversos tipos de frijoles especialmente los de la variedad roja, aunque también se cultivan otras variedades como la blanca. Los frijoles ocupan un lugar importante en la dieta diaria de los nicaragüenses, en las que son consumidos en diversas preparaciones ya sea de forma individual o combinados con otros platos. En el presente trabajo se muestra un método espectrofotométrico utilizado para la determinación de hierro en muestras de frijoles, usando para ello la complejación con o-fenantrolina. De esta forma inicialmente se optimizaron las condiciones experimentales del método y se obtuvieron sus parámetros de desempeño. Determinándose un rango lineal de 0 a 1.0 ppm, un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.99, la ausencia de efecto matriz, un porcentaje de recuperación (%R) mayor del 100%, una desviación estándar relativa (DER) de la repetibilidad y de la reproducibilidad menores del 20% y unos límites de detección y cuantificación de 0.05 ppm y 0.13 ppm respectivamente. Finalmente el método fue aplicado a la determinación del contenido de hierro en muestras de frijoles: blanco, negros y rojos antes y después de someterlos a un proceso de cocción, encontrándose diferencias significativas entre el contenido de hierro antes y después de su cocción, demostrando la utilidad del método propuesto.

II. OBJETIVOS:

II.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido del hierro en algunas muestras de frijoles antes y después de su tratamiento térmico usando la técnica de comparación de espectrofotometría de UV-Visible y el complejo de hierro - O-Fenantrolina

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar las muestras de estudio
2. Determinar los parámetros experimentales del método
3. Determinar y comparar el contenido de hierro en muestras de frijoles antes y después del tratamiento térmico.
4. Relacionar el contenido del hierro encontrado en las muestras con las dosis diarias recomendadas.

III. MARCO TEÓRICO

III.1 FRIJOLES



III.1.1 DESCRIPCIÓN

Phaseolus vulgaris es la especie más conocida del género *Phaseolus* en la familia Fabaceae con unas cincuenta especies de plantas, todas nativas de América. Es una especie anual de la familia de las leguminosas de América, que se cultiva en todo el mundo. Existen numerosas variedades y de ella se consumen tanto las vainas verdes como los granos secos. [1]

Las especies de este género son conocidas vulgarmente como porotos, frijoles, habichuelas o judías de acuerdo a las distintas regiones en las que se encuentran. Las vainas verdes se denominan ejotes, judía verde, poroto verde, vainicas o chaucha y las semillas: alubias, fabes, caraotas, chícharos, fríjoles, fabas, frejoles, frijoles, frisoles, frijones, granos, habichuelas, judías, pochás, porotos ... son las semillas comestibles de *Phaseolus vulgaris*. El nombre «frijol» viene del asturleonésfréxol y éste del latín *Phaseolus* (también el gallego feixón, el catalán fesol, el portugués feijão, el italiano fagiolo, el rumano fasole).

Son uno de los alimentos más antiguos que el hombre conoce; han formado parte importante de la dieta humana desde hace miles de años. Se encuentran entre las primeras plantas alimenticias domesticadas y luego cultivadas. El frijol domesticado más antiguo se ha encontrado en la Cueva del Guitarrero, un sitio arqueológico en Perú, y se ha aproximado su fecha de alrededor del segundo milenio AC.4 Los frijoles comunes empezaron a cultivarse hace aproximadamente 7000 años A.C. en el sur de México y Guatemala. En México, los nativos cultivaron los frijoles blancos, negros, y todas las demás variedades de color. También semillas pequeñas y semillas grandes.

MARCO TEÓRICO



Puesto que las culturas Mesoamericanas de México cruzaron el continente americano, estos frijoles y las prácticas de cultivo se propagaron poco a poco por toda Suramérica a medida que exploraban y comercializaban con otras tribus. Cuando los conquistadores de la Península Ibérica llegaron al Nuevo Mundo, florecían diversas variedades de frijoles. Cristóbal Colón les llamó faxónes y favas por su parecido a las habas del viejo mundo, los aztecas los llamaban etl, los mayas búul y quinsoncho, los incas purutu, los cumanagotos de Venezuela caraotas, en el Caribe les denominaban cunada, los chibchas jistle o histe (CARTAY, 1991). Los primeros exploradores y comerciantes llevaron posteriormente las variedades de frijol americano a todo el mundo, y a principios del siglo XVII, los frijoles ya eran cultivos populares en Europa, África y Asia. [1]

Los frijoles se ubican dentro del grupo de las leguminosas, que se caracterizan por crecer en forma de vaina y se caracteriza por ser uno de los alimentos que contienen más proteínas que constituyen hasta el 20% de nuestro peso corporal y sirven para el crecimiento, el proceso del metabolismo, la formación de anticuerpos que protegen de enfermedades y la producción de energía, entre otras funciones. [2]

III.1.2 PROPIEDADES

Los frijoles poseen un alto contenido en proteínas y en fibra, siendo así mismo una fuente excelente de minerales, su contenido nutricional promedio por cada 100 gramos de alimento crudo en peso neto es el siguiente: [1]

Valor nutricional por cada 100 g	
Energía 330 kcal 1390 kJ	
Carbohidratos	61.5 g
Fibra alimentaria	4.3 g
Grasas	1.8 g
Saturadas	0.12 g

MARCO TEÓRICO

Continuación de la tabla de valor nutricional por cada 100 g de frijoles



Valor nutricional por cada 100 g	
Energía 330 kcal 1390 kJ	
Monoinsaturadas	0.06 g
Poliinsaturadas	0.18 g
Proteínas	19.2 g
Agua	7.9 g
Vitamina A	1.0 µg (0%)
Tiamina (Vit. B1)	0.62 mg (48%)
Riboflavina (Vit. B2)	0.14 mg (9%)
Niacina (Vit. B3)	1.7 mg (11%)
Vitamina B6	0.4 mg (31%)
Ácido fólico (Vit. B9)	394 µg (99%)
Calcio	228 mg (23%)
Magnesio	140 mg (38%)
Fósforo	407 mg (58%)
Potasio	1406 mg (30%)
Sodio	24 mg (2%)
Zinc	2.79 mg (28%)

III.2 HIERRO

El hierro o fierro es un elemento químico de número atómico 26 situado en el grupo 8, periodo 4 de la tabla periódica de los elementos. Su símbolo es Fe (del latín *ferrum*) y tiene una masa atómica de 55,6 u. [3][4]



Este metal de transición es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, representando un 5% y, entre los metales, sólo el aluminio es más abundante. [3][4]

MARCO TEÓRICO

El núcleo de la Tierra está formado principalmente por hierro y níquel, generando al moverse un campo magnético. Ha sido históricamente muy importante, y un período de la historia recibe el nombre de Edad de Hierro. [3]

En cosmología, es un metal muy especial, pues es el metal más pesado que puede producir la fusión en el núcleo de estrellas masivas; los elementos más pesados que el hierro solo pueden ser creados en supernovas.

III.2.1 CARACTERÍSTICAS

Es un metal maleable, de color gris plateado y presenta propiedades magnéticas; es ferromagnético a temperatura ambiente y presión atmosférica. Es extremadamente duro y pesado.

Se encuentra en la naturaleza formando parte de numerosos minerales, entre ellos muchos óxidos, y raramente se encuentra libre. Para obtener hierro en estado elemental, los óxidos se reducen con carbono y luego es sometido a un proceso de refinado para eliminar las impurezas presentes.



Es el elemento más pesado que se produce exotérmicamente por fusión, y el más ligero que se produce a través de una fisión, debido a que su núcleo tiene la más alta energía de enlace por nucleón (energía necesaria para separar del núcleo un neutrón o un protón); por lo tanto, el núcleo más estable es el del hierro-56 (con 30 neutrones).

Presenta diferentes formas estructurales dependiendo de la temperatura y presión. A presión atmosférica:

- Hierro- α : estable hasta los 911 °C. El sistema cristalino es una red cúbica centrada en el cuerpo (bcc).

MARCO TEÓRICO

- Hierro- γ : 911 °C - 1392 °C; presenta una red cúbica centrada en las caras (fcc).
- Hierro- δ : 1392 °C - 1539 °C; vuelve a presentar una red cúbica centrada en el cuerpo.
- Hierro- ϵ : Puede estabilizarse a altas presiones, presenta estructura hexagonal compacta (hcp).

El hierro es ferromagnético hasta la temperatura de Curie (768 °C), a partir de la cual pasa a ser paramagnético. Antiguamente, al hierro- α paramagnético se le llamaba hierro- β , aunque hoy en día no se suele distinguir entre las fases α y β .

III.2.2 APLICACIONES

El hierro es el metal más usado, con el 95% en peso de la producción mundial de metal. El hierro puro (pureza a partir de 99,5%) no tiene demasiadas aplicaciones, salvo excepciones para utilizar su potencial magnético. El hierro tiene su gran aplicación para formar los productos siderúrgicos, utilizando éste como elemento matriz para alojar otros elementos aleantes tanto metálicos como no metálicos, que confieren distintas propiedades al material. Se considera que una aleación de hierro es acero si contiene menos de un 2,1% de carbono; si el porcentaje es mayor, recibe el nombre de fundición.

El acero es indispensable debido a su bajo precio y tenacidad, especialmente en automóviles, barcos y componentes estructurales de edificios.

Las aleaciones férreas presentan una gran variedad de propiedades mecánicas dependiendo de su composición o el tratamiento que se haya llevado a cabo.

III.2.3 OBTENCIÓN

Se encuentra formando parte de numerosos minerales, entre los que destacan la hematita (Fe_2O_3), la magnetita (Fe_3O_4), la limonita ($\text{FeO}(\text{OH})$), la siderita (FeCO_3), la pirita (FeS_2), la ilmenita (FeTiO_3), etc.

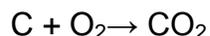
MARCO TEÓRICO

Se puede obtener hierro a partir de los óxidos con más o menos impurezas. Muchos de los minerales de hierro son óxidos, y los que no, se pueden oxidar para obtener los correspondientes óxidos.



La reducción de los óxidos para obtener hierro se lleva a cabo en un horno denominado comúnmente alto horno (también, horno alto). En él se añaden los minerales de hierro en presencia de coque y carbonato de calcio, CaCO_3 , que actúa como escorificante.

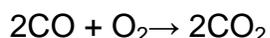
Los gases sufren una serie de reacciones; el coque puede reaccionar con el oxígeno para formar dióxido de carbono:



A su vez el dióxido de carbono puede reducirse para dar monóxido de carbono:

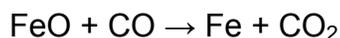


Aunque también se puede dar el proceso contrario al oxidarse el monóxido con oxígeno para volver a dar dióxido de carbono:



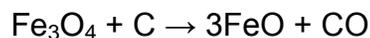
El proceso de oxidación de coque con oxígeno libera energía y se utiliza para calentar (llegándose hasta unos 1900°C en la parte inferior del horno).

En primer lugar los óxidos de hierro pueden reducirse, parcial o totalmente, con el monóxido de carbono, CO ; por ejemplo:



Después, conforme se baja en el horno y la temperatura aumenta, reaccionan con el coque (carbono en su mayor parte), reduciéndose los óxidos. Por ejemplo:

MARCO TEÓRICO

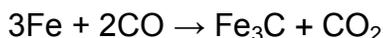


El carbonato de calcio (caliza) se descompone:



Y el dióxido de carbono es reducido con el coque a monóxido de carbono como se ha visto antes.

Más abajo se producen procesos de carburación:



Finalmente se produce la combustión y desulfuración (eliminación de azufre) mediante la entrada de aire. Y por último se separan dos fracciones: la escoria y el arrabio: hierro fundido, que es la materia prima que luego se emplea en la industria. El arrabio suele contener bastantes impurezas no deseables, y es necesario someterlo a un proceso de afino en hornos llamados convertidores.

En 2000 los cinco mayores productores de hierro eran China, Brasil, Australia, Rusia e India, con el 70% de la producción mundial. Actualmente el mayor yacimiento de Hierro del mundo se encuentra en la región de "El Mutún", en el departamento de Santa Cruz, Bolivia; dicho yacimiento cuenta con más de 40.000.000 de toneladas para explotar.

III.2.4 COMPUESTOS

- Los estados de oxidación más comunes son +2 y +3. Los óxidos de hierro más conocidos son el óxido de hierro (II) (FeO), el óxido de hierro (III), Fe₂O₃, y el óxido mixto Fe₃O₄.

Forma asimismo numerosas sales y complejos en estos estados de oxidación. El hexacianoferrato (II) de hierro (III), usado en pinturas, se ha denominado azul de Prusia o azul de Turnbull; se pensaba que eran sustancias diferentes.



MARCO TEÓRICO

- Se conocen compuestos en el estado de oxidación +4, +5 y +6, pero son poco comunes, y en el caso del +5, no está bien caracterizado. El ferrato de potasio (K_2FeO_4), en el que el hierro está en estado de oxidación +6, se emplea como oxidante. El estado de oxidación +4 se encuentra en unos pocos compuestos y también en algunos procesos enzimáticos.
- El Fe_3C se conoce como cementita, que contiene un 6,67 % en carbono, al hierro α se le conoce como ferrita, y a la mezcla de ferrita y cementita, perlita o ledeburita dependiendo del contenido en carbono. La austenita es una solución sólida intersticial de carbono en hierro γ (Gamma).

III.2.5 METABOLISMO

Aunque solo existe en pequeñas cantidades en los seres vivos, el hierro ha asumido un papel vital en el crecimiento y en la supervivencia de los mismos y es necesario no solo para lograr una adecuada oxigenación tisular sino también para el metabolismo de la mayor parte de las células.



En la actualidad con un incremento en el oxígeno atmosférico el hierro se encuentra en el medio ambiente casi exclusivamente en forma oxidada (o férrica Fe^{3+}) y en esta forma es poco utilizable.

En los adultos sanos el hierro corporal total es de 3 a 4 gramos ó 35 mg/kg en las mujeres a 50 mg/kg en los hombres. Se encuentra distribuido en dos formas:

✓ **70% como hierro funcional (2,8g):**

- Eritrocitos (65%).
- Tisular: mioglobinas (4%).
- Enzimas dependientes del hierro (hem y no hem): 1%

MARCO TEÓRICO

Estas son enzimas esenciales para la función de las mitocondrias y que controlan la oxidación intracelular (citocromos, oxidasas del citocromo, catalasas, peroxidasas).

Transferrina (0,1%), la cual se encuentra normalmente saturada en 1/3 con hierro.

La mayor atención con relación a este tipo de hierro se ha enfocado hacia el eritrón, ya que su estatus de hierro puede ser fácilmente medible y constituye la principal fracción del hierro corporal.

✓ 30% como hierro de depósito (1 g):

- Ferritina (2/3).
- Hemosiderina (1/3).
- Hemoglobina: Transporta el oxígeno a las células.
- Transferrina: Transporta el hierro a través del plasma.
- Ferritina: Principal forma de depósito del hierro en los tejidos.



III.2.6 ISÓTOPOS

El hierro tiene cuatro isótopos estables naturales: ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe y ^{58}Fe , Las abundancias relativas en las que se encuentran en la naturaleza son de aproximadamente: ^{54}Fe (5,8%), ^{56}Fe (91,7%), ^{57}Fe (2,2%) y ^{58}Fe (0,3%).

III.2.7 PRECAUCIONES

La siderosis es el depósito de hierro en los tejidos. El hierro en exceso es tóxico. El hierro reacciona con peróxido y produce radicales libres; la reacción más importante es:



Cuando el hierro se encuentra dentro de unos niveles normales, los mecanismos antioxidantes del organismo pueden controlar este proceso.

La dosis letal de hierro en un niño de 2 años es de unos 3 g. 1 g puede provocar un envenenamiento importante. El hierro en exceso se acumula en el hígado y provoca daños en este órgano. [3]

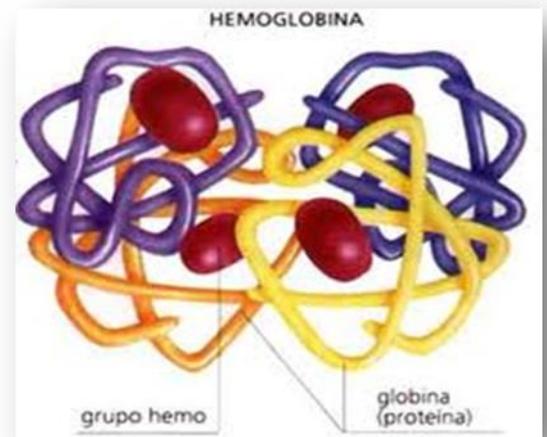
III.2.8 CLASIFICACIÓN

Este micro mineral u oligoelemento, interviene en la formación de la hemoglobina y de los glóbulos rojos, como así también en la actividad enzimática del organismo. [5]

Dado que participa en la formación de la hemoglobina de más está decir que transporta el oxígeno en sangre y que es importante para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria. Las reservas de este mineral se encuentran en el hígado, el bazo y la médula ósea.

Se clasifica en hierro hémico y no hémico:

- El hémico es de origen animal y se absorbe en un 20 a 30%. Su fuente son las carnes (especialmente las rojas).
- El no hémico, proviene del reino vegetal, es absorbido entre un 3 y 8 % y se encuentra en las legumbres, hortalizas de hojas verdes, salvado de trigo, los frutos secos, las vísceras y la yema de huevo.



El hierro hémico es fácil de absorber mientras que el hierro no hémico es convertido por medio del ácido clorhídrico presente en el estómago a hierro ferroso y así es capaz de ser absorbido en el intestino delgado, precisamente en el duodeno y parte alta del yeyuno.

El transporte se realiza en la sangre, mayormente a través de una proteína proveniente del hígado, llamada transferrina y es distribuido en los tejidos. Es almacenado en forma de ferritina o hemosiderina en el bazo, el hígado y la médula ósea. En ausencia de sangrado (incluyendo la menstruación) o embarazo su pérdida es mínima. Se excreta principalmente en las heces.

Para mejorar la absorción del hierro no hémico siempre es bueno consumir conjuntamente alimentos que contengan vitamina C.

MARCO TEÓRICO

Los inhibidores de la absorción de hierro no hémico son: el té, café, la leche bovina, la clara del huevo, el salvado de trigo y los productos de soya.

La falta de hierro en el organismo puede producir mala síntesis proteica, deficiencia inmunitaria, aumento del ácido láctico, aumento de noradrenalina, menor compensación de enfermedades cardiopulmonares y anemia.

La forma de identificarlo que demuestra carencia de hierro es una menor respuesta al estrés, menor rendimiento laboral, alteración en la conducta y mala regulación térmica.

Las necesidades diarias de hierro son del orden de los 8 a 11 mg. /día, requiriendo un 50% adicional las mujeres y los hombres deportistas y hasta doble las mujeres deportistas (20 a 25 mg. /día).

III.2.9 FUNCIONES

- **Transporte y depósito de oxígeno en los tejidos:**

El grupo hemo o hem que forma parte de la hemoglobina y mioglobina está compuesto por un átomo de hierro. Estas son proteínas que transportan y almacenan oxígeno en nuestro organismo. La hemoglobina, proteína de las sangre, transporta el oxígeno desde los pulmones hacia el resto del organismo.

La mioglobina juega un papel fundamental en el transporte y el almacenamiento de oxígeno en las células musculares, regulando el oxígeno de acuerdo a la demanda de los músculos cuando entran en acción.

- **Metabolismo de energía:**

Interviene en el transporte de energía en todas las células a través de unas enzimas llamadas citocromos que tienen al grupo hemo o hem (hierro) en su composición.



- **Antioxidante:**

Las catalasas y las peróxidas son enzimas que contienen hierro que protegen a las células contra la acumulación de peróxido de hidrógeno (químico que daña a las células) convirtiéndolo en oxígeno y agua.



- **Síntesis de ADN:**

El hierro interviene en la síntesis de ADN ya que forma parte de una enzima (ribonucleótido reductasa) que es necesaria para la síntesis de ADN y para la división celular.

- **Sistema nervioso:**

El hierro tiene un papel importante en sistema nervioso central ya que participa en la regulación los mecanismos bioquímicos del cerebro, en la producción de neurotransmisores y otras funciones encefálicas relacionadas al aprendizaje y la memoria como así también en ciertas funciones motoras y reguladoras de la temperatura.

- **Detoxificación y metabolismo de medicamentos y contaminantes ambientales:**

El Citocromo p450 es una familia de enzimas que contienen hierro en su composición y que participa en la degradación de sustancias propias del organismo (esteroides, sales biliares) como así también en la detoxificación de sustancias exógenas, es decir la liberación sustancias que no son producidas por nuestro organismo.

- **Sistema inmune:**

La enzima mieloperoxidasa está presente en los neutrófilos que forman parte de las células de la sangre encargadas de defender al organismo contra las infecciones o materiales extraños. Esta enzima, que presenta en su composición un grupo hemo

MARCO TEÓRICO

(hierro), produce sustancias (ácido hipocloroso) que son usadas por los neutrófilos para destruir las bacterias y otros microorganismos.



III.2.10 FUENTES NATURALES

Las siguientes tablas mencionan los miligramos (mg) de hierro hémico y no hémico presentes en una porción de alimento.

Alimentos con hierro no hémico

Alimento	Porción	Hierro en mg (miligramos)
Cereales, 100% fortificados con hierro	¾ taza (30 gr)	18
Avena, instantánea, fortificada, preparada con agua	1 taza	10
Semilla de soja, hervidas	1 taza (170 gr)	8.8
Lentejas, hervidas	1 taza (200 gr)	6.6
Espinaca, fresca, hervida, escurrida	1 taza (180gr)	6.4
frijoles/judías, hervidas	1 taza	5.2
Espinaca, enlatada, escurrida	1 taza (215 gr)	4.9
Cereales, fortificado con 25% de hierro	¾ taza (30 gr)	4.5
Habas, hervidas	1 taza	4.5
Tofu, crudo, firme	½ taza	3.4
Sémola, blanca, enriquecida, preparada con agua	1 taza	1.5
Pasas de uva, sin semilla	½ taza	1.5
Almendras, pistachos	30 gr	1.2

MARCO TEÓRICO

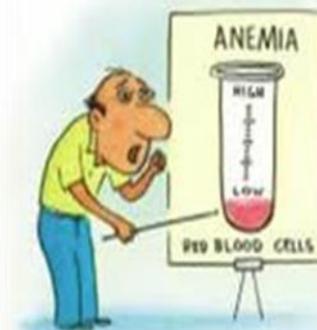
Pan de harina integral/harina blanca	1 rodaja	0.9
Yema de huevo	1	0.45

Alimentos ricos en hierro hémico

Alimento	Porción	Hierro en mg (miligramos)
Hígado de pollo, cocido	100 gr	12
Almejas y otros moluscos, enlatados	85 gr	23
Carne de pavo, cocida	145 gr	11
Carne de vaca, picada 80 % magra	100 gr	2.5
Hígado de vaca, cocido	100 gr	6.2
Pollo, pechuga asada	100 gr	1.1
carne de cerdo, asada	100 gr	0.9
Atún, enlatado en agua	100 gr	0.9

III.2.11 DEFICIENCIA DE HIERRO

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la deficiencia de hierro se considera el primer desorden nutricional en el mundo. El desarrollo de la deficiencia de hierro es gradual y el comienzo se da con un balance negativo de hierro es decir cuando la ingesta de hierro de la dieta no satisface las necesidades diarias. Se produce una disminución en el depósito de hierro del organismo pero los niveles de hemoglobina permanecen normales. Por otro lado la anemia por deficiencia de hierro (anemia ferropénica) es un estado avanzado en la disminución del hierro. Aquí los niveles de hemoglobina se encuentran por debajo de lo normal. [5]



III.2.12 FACTORES QUE AFECTAN LA ABSORCIÓN DEL HIERRO

MARCO TEÓRICO

Un adulto sano absorbe aproximadamente entre 10% y 15% del hierro de la dieta. Pero dicha absorción estará influenciada por diferentes factores que pueden favorecerla o disminuirla. [5][6]

Así mismo depende del tipo de hierro que se consuma. La absorción de hierro hémico es del 15% al 35% y no es significativamente afectada por la dieta. Contrariamente la absorción del hierro no hémico es del 2% al 20% y tiene gran influencia de otros componentes de la dieta. [5][6]



III.2.13 FACTORES QUE FAVORECEN LA ABSORCIÓN DEL HIERRO: [5]

- **Vitamina C (ácido ascórbico):** Mejora la absorción del hierro no hémico ya que convierte el hierro férrico de la dieta en hierro ferroso, el cual es más soluble y puede atravesar la mucosa intestinal.
- **Otros ácidos orgánicos:** Ácido cítrico, ácido láctico y ácido málico también benefician la absorción de hierro no hémico.
- **Proteínas de la carne:** Además de proveer hierro hémico (altamente absorbible) favorecen la absorción de hierro no hémico promoviendo la solubilidad del hierro ferroso.
- **Vitamina A:** Mantiene al hierro soluble y disponible para que pueda ser absorbido ya que compite con otras sustancias, polifenoles y fitatos, que unen hierro y lo hacen poco absorbible. La combinación de vitamina A con hierro se usa para mejorar la anemia ferropénica (por deficiencia de hierro).

III.2.14 FACTORES QUE REDUCEN LA ABSORCIÓN DE HIERRO:

- **Ácido fítico (fitatos):** Se encuentra en arroz, legumbres y granos enteros. Si bien las legumbres y los cereales tienen alto contenido de hierro no hémico, no se los considera una buena fuente de hierro ya que también son ricos en fitatos,

MARCO TEÓRICO

los que inhiben la absorción del hierro no hémico. Pequeñas cantidades de ácido fítico (5 a 10 mg) pueden disminuir la absorción del hierro no hémico en un 50 %.

La industria alimenticia ha disminuido el contenido de fitatos utilizando enzimas, como las fitasas, capaces de degradar el ácido fítico y así aumentar el uso del mismo.

- **Taninos:** Se encuentran en algunas frutas, vegetales, café, té (negro, verde) vinos, chocolate, frutos secos y especias (orégano). Pueden inhibir la absorción ya que se combinan con el hierro formando un compuesto insoluble.

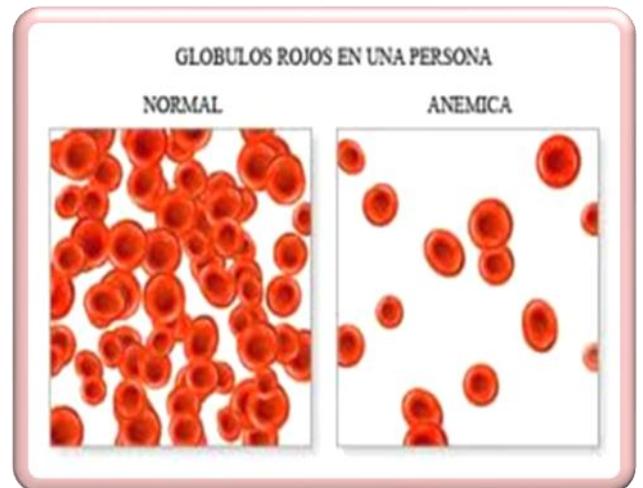


- **Proteínas vegetales:** Las proteínas de la soja (tofu) tiene un efecto inhibitorio en la absorción del hierro no hémico que no depende del contenido de fitatos.
- **Calcio:** Cuando el calcio se consume junto al hierro en una comida, el calcio disminuye la absorción de hierro hémico como el no hémico. El calcio tiene un efecto inhibitorio que depende de sus dosis.

III.2.15 ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO

Se caracteriza por ser microcítica e hipocrómica es decir que los glóbulos rojos tiene un tamaño más pequeño que el normal y el contenido de hemoglobina es menor dando glóbulos rojos pálidos.

Existe carencia de hierro por aumento de la demanda de hierro, por malnutrición o dieta deficitaria o por malabsorción lo que trae como consecuencia disminución de la



hemoglobina y de la cantidad de glóbulos rojos o hematíes. Sin el hierro, la hemoglobina no puede suministrar el oxígeno necesario a los tejidos de nuestro organismo.



III.2.15.1 SÍNTOMAS:

Palidez, cansancio o debilidad, irritabilidad, taquicardia, dificultades en el aprendizaje, mayor susceptibilidad a infecciones, dificultades respiratorias, glositis (inflamación de la lengua), dificultad para mantener la temperatura corporal, uñas quebradizas, dolor de cabeza.

III.2.16 ¿QUIÉNES NECESITAN DOSIS EXTRAS DE HIERRO PARA PREVENIR SU DEFICIENCIA?

- **Mujeres embarazadas:** requieren alrededor del doble de hierro debido a que el volumen sanguíneo aumenta durante el embarazo, a las necesidades en aumento del bebe y por la pérdida de sangre que ocurre durante el parto. Utilizan el hierro para el normal desarrollo del feto y la placenta.
- 
- **Bebes prematuros o con bajo peso al nacer:** tienen niveles bajos de hierro en comparación con un bebe en buen estado de salud ya que el bebe no logra una acumulación significativa de hierro que se da pasadas las 32 semanas de gestación.
 - **Niños entre 6 meses y 4 años:** debido al rápido crecimiento que se produce durante esta etapa.
 - **Adolescentes:** también es una etapa de crecimiento tanto para varones como mujeres por lo cual el requerimiento de hierro es alto durante esta etapa. Además las mujeres presentan perdidas menstruales
 - **Mujeres en edad reproductiva:** la pérdida de hierro se da ante la menstruación.

MARCO TEÓRICO

- **Individuos con alteraciones gastrointestinales:** no pueden absorber el hierro normalmente. Se da, entre otros, en casos de enfermedad celíaca y Síndrome de Crohn.
- **Individuos con fallo renal:** el riñón no puede formar suficiente eritropoyetina (hormona que estimula a la médula ósea para formar glóbulos rojos). Aquellos que están bajo diálisis pueden desarrollar anemia ya que el hierro como la eritropoyetina puede perderse durante la diálisis
- **Individuos con pérdida crónica de sangre:** por hemorragia gastrointestinal (ulcera péptica, hernia hiatal, varices esofágicas, cáncer, parasitosis, colitis ulcerosas), por donación de sangre, hemorragias genitourinarias.
- **Vegetarianos:** aquellos vegetarianos que no comen ningún tipo de producto animal necesitan alrededor del doble de hierro por día comparado a los no vegetarianos. Esto se da debido a que la absorción de hierro no hémico provenientes de legumbres, vegetales, etc. es mucho menor. Se recomienda consumir alimentos con hierro no hémico junto a vitamina C (cítricos) para así aumentar la absorción del mismo.

III.2.17 DOSIS DIARIAS RECOMENDADAS DE HIERRO

En la siguiente tabla se muestran los valores de la ingesta diaria recomendada de hierro según el Departamento de Nutrición del IOM (Instituto de Medicina) tanto para infantes, niños y adultos.

Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
0-6 meses	0.27 (IA)*	0.27
7-12 meses	11	11
1-3 años	7	7
4-8 años	10	10
9-13 años	8	8
14-18 años	11	15
19-50 años	8	18



>50 años	8	8
Embarazo		27
Lactancia		9-10

Los niños recién nacidos y en buen estado de salud cuentan con una reserva de hierro que dura entre 4 a 6 meses. Hasta el momento no existe evidencia disponible para establecer la dosis diaria recomendada desde nacimiento hasta los 6 meses de edad. La ingesta de hierro recomendada para bebés de hasta 6 meses se basa en la Ingesta Adecuada (IA) que refleja la ingesta promedio de hierro de bebés saludables que se alimentan con leche materna.

El hierro de la leche materna es bien absorbido por los infantes. Se estima que los infantes utilizan más del 50% del hierro presente en la leche materna comparado con menos del 12% del hierro presente en la fórmula. Se recomienda la lactancia materna durante al menos los primeros 6 meses de vida y luego la incorporación gradual de comidas sólidas con contenido de hierro desde los 7 a 12 meses de edad. En caso contrario las fórmulas deben estar fortificadas con hierro (4 a 12 miligramos de hierro por litro).

III.2.18 TOXICIDAD

Se puede producir una sobredosis de hierro (toxicidad aguda) en los niños menores de 6 años ante una ingesta accidental de suplementos de hierro dando vómitos, diarrea, dolor abdominal llegando a dificultades respiratorias, coma y muerte.

Altas dosis de suplementos de hierro en adultos pueden traer complicaciones gastrointestinales como constipación, náusea, vómitos, diarrea, especialmente si son tomados con el estómago vacío.

MARCO TEÓRICO

Existe un alto potencial de tener toxicidad de hierro dado que muy poca cantidad de hierro es excretado por el organismo. Además el hierro tiende a acumularse en los tejidos y órganos cuando sus depósitos están saturados.

Los individuos con hemocromatosis pueden desarrollar una sobrecarga de hierro. La hemocromatosis es una enfermedad hereditaria que altera el metabolismo del hierro haciendo que se acumule en grandes cantidades en el organismo a lo largo de toda su vida ocasionando daño a distintos órganos.

Los individuos con anemias severas (que no son causadas por deficiencia de hierro) que necesitan transfusiones de sangre también pueden desarrollar una sobrecarga de hierro.

Ante la deficiencia de hierro, la terapia con suplementos de hierro puede ocasionar: irritación gastrointestinal, náusea, vómitos, diarrea, constipación, heces oscuras.

El Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias (Institute of Medicine of the National Academy of Sciences) ha establecido la ingesta máxima tolerable de hierro para individuos sanos. Personas con hemocromatosis hereditaria, con cirrosis hepática y otros problemas hepáticos pierden tener efectos adversos con ingestas menores a éstas: [5]

Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
0-12 meses	40	40
1-13 años	40	40
14-18 años	45	45
>19 años	45	45



MARCO TEÓRICO

Embarazo		45
Lactancia		45



III.2.19 EL HIERRO EN EL ORGANISMO

El cuerpo humano posee una cantidad de hierro que ha podido ser evaluada aproximadamente en 2 gramos. Esta cantidad se halla distribuida del siguiente modo: [7]

- 2,5 gramos se encuentran en la hematina, sustancia albuminoidea que entra en la composición de la hemoglobina.
- 0,5 gramos están diseminados en la médula de los huesos, en el bazo (que actúa como almacén de reserva) y en el hígado, donde se combina con una sustancia proteica: la ferrina. [7]

III.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DEL HIERRO

Para el análisis de hierro en este trabajo pueden aplicarse tres métodos los cuales se mencionan a continuación: [8]

1. Método colorimétrico (fenantrolina).
2. Método espectrométrico de absorción atómica.
3. Método de plasma de acoplamiento inductivo.

III.3.1 MÉTODO COLORIMÉTRICO (FENANTROLINA).

Se disuelve el Fe, se reduce a hierro (II) por ebullición con ácido e hidroxilamina y se trata con 1,10-fenantrolina a pH=3,2-3,3. [8][9]

El complejo rojo-naranja que se forma es un quelato de tres moléculas de fenantrolina por átomo de Fe. La solución coloreada obedece a la ley de Beer, su

MARCO TEÓRICO

intensidad es independiente del pH entre 3 y 9, aunque un pH ácido (2,9 - 3,4) asegura un rápido desarrollo del color.

Los oxidantes fuertes, cianuro, nitrito, fosfatos, cromo, zinc, cobalto y cobre. El bismuto, el cadmio, el mercurio, el molibdato y la plata precipitan la fenantrolina. La adición de un exceso de hidroxilamina elimina los errores causados por exceso de reactivos oxidantes. En presencia de iones metálicos, es necesario utilizar mayor exceso de fenantrolina, aunque también se puede realizar una extracción.

Si existen cantidades de materia orgánica o colorante, puede ser necesario evaporar la muestra, llevar el residuo a combustión seca suave, y volver a disolver en ácido. La presencia de cantidades excesivas de materia orgánica puede hacer necesaria una digestión. Las concentraciones tan bajas como 10 mg/L pueden detectarse con un espectrofotómetro provisto de cubetas con un camino óptico de 5 cm o más largo.[8][9]

III.3.2 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Es una técnica muy relacionada con la fotometría de llama ya que se utiliza una llama para atomizar la disolución de la muestra de modo que los elementos a analizar se encuentran en forma de vapor de átomos. En absorción atómica existe una fuente independiente de luz monocromática, específica para cada elemento a analizar y que se hace pasar a través del vapor de átomos, midiéndose posteriormente la radiación absorbida. [8]

En fotometría de llama la sensibilidad es proporcional al número de átomos que se han excitado, mientras que, en absorción atómica la sensibilidad depende del número de átomos que se encuentran en el estado fundamental. Normalmente, tan sólo un pequeño porcentaje de átomos se encuentran en estado excitado en la llama. Por lo tanto, la absorción atómica da lugar, en general, a una mayor sensibilidad que la fotometría de llama para un gran número de elementos.

La absorción atómica es una técnica que presenta menos interferencias y es más simple que la fotometría de llama, lo que explica el espectacular desarrollo de la técnica en los últimos años.

La absorción atómica no ha eliminado el uso de la fotometría, sino que ambos métodos deben considerarse complementarios, siendo la sensibilidad de cada uno de ellos superior a la del otro para determinados elementos.

III.3.3 MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO.

La espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma.

Durante el proceso de desexcitación de los átomos neutros e iones en el interior de un plasma, se producen las emisiones de radiación electromagnética en la zona del UV-visible. Estas radiaciones, características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda y finalmente se mide su intensidad. La selección de la longitud de onda nos permite determinar el metal cualitativamente, mientras que la intensidad de la radiación emitida nos proporcionará la información para poder cuantificarlo.

Un plasma es un gas ionizado, eléctricamente neutro y confinado en un tubo de descarga. Es un estado de equilibrio entre partículas cargadas y neutras de un gas ionizado. Las temperaturas alcanzadas son notablemente superiores a la de la absorción atómica (AAS).

Un sistema típico de análisis elemental por espectroscopia con un plasma con fuente de excitación y atomización está constituido por:

- **El plasma:** Que deberá reunir ciertas condiciones de temperatura, confinamiento, etc.
- **El generador eléctrico:** Que aportará la energía externa al plasma que la disipará en forma térmica y radiante.

MARCO TEÓRICO

- **El sistema de introducción de la muestra:** Que deberá permitir un eficaz aporte de la muestra al conjunto.
- **El sistema de alimentación de gas:** Que asegure el funcionamiento del plasma, el transporte de la muestra, la formación del aerosol con la muestra, la purga del sistema óptico y la refrigeración de la antorcha.
- **El sistema óptico:** Que permitirá analizar el espectro emitido por el plasma.
- **El sistema de tratamiento de la señal:** Que permitirá análisis cualitativo y cuantitativo a partir de las radiaciones emitidas.

III.4 LÍMITE DE DETECCIÓN DE HIERRO EN LAS TÉCNICAS

Los límites de detección para el procedimiento espectrométrico de absorción atómica, el método de plasma de acoplamiento inductivo y el método colorimétrico de la fenantrolina, son similares para el análisis de agua natural o tratada. Los reactivos complejantes utilizados son específicos para hierro (II), pero los procedimientos de absorción atómica no lo son. Sin embargo, debido a la inestabilidad del Fe (II), que pasa fácilmente a hierro (III) en solución en contacto con el aire, la determinación de hierro (II) requiere precauciones especiales y puede ser necesaria realizarla in situ en el momento de la toma de muestra.

El procedimiento del método de la fenantrolina tiene cierta limitación en su aplicabilidad, ha de evitarse un almacenamiento prolongado o la exposición a la luz. Con un procedimiento especial utilizando batofenantrolina se puede obtener una distinción cuantitativa de hierro (II) y hierro (III). Los métodos espectrométrico que utilizan batofenantrolina y otros reactivos orgánicos son capaces de determinar concentraciones de hierro tan bajas como 1 mg/L. Hay un procedimiento de quimioluminiscencia que puede determinar 5 mg/L. [8]

III.5 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV/VIS)

La espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopia de fotones y una



MARCO TEÓRICO

espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (IR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. [10]

La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia.

Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

Se utiliza extensivamente en laboratorios de química y bioquímica para determinar pequeñas cantidades de cierta sustancia, como las trazas de metales en aleaciones o la concentración de cierto medicamento que puede llegar a ciertas partes del cuerpo.

La espectrofotometría UV/Vis es un equipo que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante. El vidrio, que parece ser completamente transparente, absorbe longitudes de onda que pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del IR. La absorción de las radiaciones UV, visibles e IR depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. El color de las sustancias se debe a que absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y sólo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbida.

Esta espectrofotometría utiliza radiaciones del campo UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, por

lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro. Se rige por una ley muy importante: la ecuación de Beer-Lambert. [10]

III.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN EN MÉTODOS DE ANÁLISIS CUANTITATIVOS

Existen diferentes criterios de la selección de los parámetros de calidad a considerar en la validación según diferentes organismos como la ONA (Oficina Nacional de Acreditación) e internacionales como la AOAC, la convención de farmacopea de USA (USP), conferencia internacional de armonización (ICH) unión europea o los establecidos por la ISO/IEC 17025. Desafortunadamente no hay unanimidad en todas las organizaciones e incluso, a veces, en el concepto para algunos parámetros. Los parámetros de validación en estudios indicados por la ISO, ICH y otras organizaciones son: [11] [12]

- Precisión
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Especificidad/Selectividad
- Linealidad y rango
- Inercia diferenciando (Robustez y Solidez) AOAC
- Incertidumbre

III.6.1 PRECISIÓN: La precisión se define como el grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas de una misma muestra. Desde un punto de vista estadístico la precisión mide la dispersión de un grupo de resultados alrededor de la media.

MARCO TEÓRICO

Se distinguen tres contextos en el estudio de la precisión: Repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad.

III.6.2 REPETIBILIDAD: Es la precisión obtenida analizando alícuotas de una muestra homogénea sometidas independientemente a todo el proceso analítico en las condiciones más favorables; mismo método, mismo análisis, mismo equipo, mismos volumétricos, mismas condiciones y repetidas en un corto periodo de tiempo en un día si es posible.

III.6.3 PRECISIÓN INTERMEDIA: Llamada también reproducibilidad intralaboratorio y se determina comparando los resultados de la precisión de un método a lo largo del tiempo en un mismo laboratorio. La precisión intermedia puede reflejar diferentes días, operadores, instrumentos o alguna combinación de ellos en un mismo laboratorio.

III.6.4 REPRODUCIBILIDAD: Es la precisión obtenida analizando alícuotas de, muestras homogéneas en las condiciones menos favorables, distintos analistas, diferentes instrumentos, diferentes periodos de tiempo en diferentes laboratorios. El objetivo es verificar si el método dará los mismos resultados en los diferentes laboratorios. La evaluación de la precisión se fundamenta en parámetros estadísticos basados en las distribuciones normales o gaussianas.

III.6.5 EXACTITUD: La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor verdadero o el valor de referencia aceptado (ISO). La exactitud está relacionada con términos como veracidad y bias que caracterizan los errores sistemáticos. Existen bastantes confusiones sobre ellos ya que las definiciones dadas por diferentes organismos son algunas veces contradictorias. ISO define la veracidad como el grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una amplia serie de resultados de un ensayo y el valor de referencia aceptado. La definición añade que la medida de la veracidad se expresa en bias, es decir la veracidad es el concepto y bias es la medida. En términos prácticos según ISO ambos términos esencialmente significan lo mismo.

La IUPAC asigna esta definición a bias pero no reconoce el término veracidad.

La AOAC establece una jerarquía entre ellos:

- Exactitud: Diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero aceptado o asignado como verdadero.
- Veracidad: Diferencia entre una medida de resultado de un ensayo y el valor verdadero aceptado o asignado como verdadero.
- Bías: Diferencia entre la media de un número elevado de resultados de un ensayo y el valor verdadero aceptado o asignado como verdadero.

III.6.6 ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD: El término especificidad se refiere a un método que produce respuesta para un único analito, mientras que el término selectivo se refiere a un método que responde a varios analitos pero con respuestas diferenciadas entre sí. Debido a que pocos métodos responden a un único analito, el término selectivo es generalmente más apropiado.

III.6.7 LINEALIDAD: La linealidad de un método es su capacidad para obtener resultados que son proporcionales a la concentración del analito en la muestra de un rango determinado, bien directamente o a través de una transformación matemática. En general la linealidad se determina realizando de 3 a 6 medidas de 5 o más estándares cuyas concentraciones cubran entre el 80 y 120 % del rango esperado. La evaluación de la linealidad se realiza de forma gráfica o, de forma alternativa, matemáticamente.

Si los residuales no muestran una tendencia estando los valores positivos y negativos igualmente distribuidos y el error aleatorio es bajo la linealidad puede aceptarse.

Por otro lado existen también métodos matemáticos para evaluar la linealidad:

- Valor de coeficiente de correlación, r , entre 0.98 y 1.
- El valor de n exponente en la ecuación de regresión: $y = mx^n + b$ debe de estar entre 0.9 y 1.1
- Test de falta de ajustes (lack of fit F – test) el cual evalúa la probabilidad de que la diferencia o sesgo entre los valores experimentales o predichos por el modelo

(residuales) sea debida exclusivamente al error aleatorio experimental y no a la existencia de la curvatura.

III.6.8 RANGO: El rango de un método analítico es el intervalo de aplicación, en unidades de concentración entre el nivel más alto y más bajo de analito que se puede determinar con exactitud y linealidad usando el método. No existe requerimiento específicos para este parámetro aunque si es importante señalar que la linealidad debe establecerse en el rango de concentración establecidas.

III.6.9 LÍMITE DE DETECCIÓN: el límite de detección es la mínima concentración, que proporciona una señal significativamente diferente a la del blanco, es decir que puede considerarse causada por el analito con una confianza de $(1 - \alpha) 100$, si la señal es inferior solo puede decirse con una confianza de $(1 - \beta) 100 \%$, que la concentración del componente es menor que un determinado valor.

Recordando que α o error de la 1° especie es la posibilidad de que la señal del blanco sea considerada como señal de la muestra lo que origina falsos positivos (error: rechazo de una hipótesis cierta) mientras que el error β o 2° especie es la probabilidad de que la señal de la muestra sea considerada como señal del blanco originándose los falsos negativos (error: aceptación de una hipótesis falsa).

III.6.10 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN: Se define como la mínima concentración de analito que origina medidas cuantitativas con aceptable exactitud y precisión que puede considerarse como el límite inferior del rango lineal.

III.6.11 INERCIA: La inercia mide la resistencia de un método analítico a generar valores inexactos cuando se modifica ligeramente el valor operacional de las condiciones experimentales.

El estudio de la inercia puede llevarse a cabo atendiendo dos tipos de modificaciones, lo que da lugar a que pueda caracterizarse a través de dos propiedades:

MARCO TEÓRICO

- a. Robustez (robustness): Mide la resistencia de un procedimiento a generar valores sesgados (con errores sistemáticos) cuando se modifica el valor nominal de las variables experimentales intrínsecas al proceso, concentraciones, pH, temperatura, velocidad de flujo, etc.
- b. Solidez (ruggedness): mide la resistencia cuando se modifican condiciones experimentales extrínsecas al proceso: reactivos y o consumibles (lotes fabricantes), equipos (aparatos, instrumentos, sistemas informáticos) operadores, condiciones ambientales, días, etc.

Es necesario indicar que los estudios de solidez así definidos son iguales a los de precisión intermedia, por tanto este término de solidez va dirigido a estudios interlaboratorio.

La robustez evalúa principalmente variables cuantitativas (también son posibles cualitativas presencia/ausencia de cierto componente) mientras que la solidez tiene que ver con variables fundamentalmente de tipo cualitativas. Ambas pretenden estimar la influencia de un cambio en todos los factores de interés sobre la respuesta predicha, para una determinada concentración de analito.

III.6.12 INCERTIDUMBRE: La incertidumbre se define como un parámetro asociado con el resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando (VIM). [11][12]

III.7 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Para poder realizar el tratamiento de los datos obtenidos del análisis de muestras de distintos orígenes, se suelen usar diferentes estrategias de tratamiento estadístico, de estos datos.[13]

Por lo que los laboratorios, utilizan una gran variedad de herramientas estadísticas definidas para usos generales o concretos. Los datos se deben obtener mínimo por

MARCO TEÓRICO

triplicado, para mayor seguridad de los mismo y luego se procede a definir que o cual herramienta nos sirve para el propósito que nos hemos planteado.

En nuestro caso, el fin es el comparar, relacionar o asociar muestras, y por lo tanto se deben emplear 2 herramientas, entre las que se mencionan:

1. Comparación de varianzas a través de los test de Fisher, Bartlett o Levene.
2. Comparación de medias: con varianzas iguales o diferentes

III.7.1 PRUEBA DE BARTLETT

La prueba de Bartlett es la técnica que más es usada para comparar las varianzas de varias muestras y para determinar si las muestras son iguales. Si hay igualdad esto se denomina homogeneidad u homocedasticidad de las varianzas. En esta prueba los n_i en cada valor de X no necesitan ser iguales; sin embargo se recomienda que los n_i no sean menores que 3 y muchos de los n_i deben ser mayores de 5.

Para el desarrollo de la prueba de Bartlett se debe calcular inicialmente una varianza conjunta, definida como:

$$S^2 = \frac{\sum (n_i - 1) S_i^2}{\sum (n_i - 1)}$$

En donde se toman en cuenta todas las varianzas de las n_i muestras. Una vez obtenido su valor se calcula un factor de corrección definido por C.

$$C = \frac{1 + \sum_{i=1}^h \left(\frac{1}{n_i - 1} - \frac{1}{N - h} \right)}{3(h - 1)}$$

En donde N es el número total de datos, h es el número de series y N-h es número total de grados de libertad.

$$\chi^2 = \frac{1}{C} \left| (N - h) \ln S^2 - \sum_{i=1}^h (n_j - 1) \ln S_i^2 \right|$$

En esta prueba las hipótesis nula y alternativa son:

$$H_0 = S_1^2 = S_2^2 = S_3^2 = S_4^2 = S_5^2 = \dots S_i^2$$

$$H_1 = S_1^2 \neq S_2^2 \neq S_3^2 \neq S_4^2 \neq S_5^2 \neq \dots S_i^2$$

Se acepta H_0 si:

$$\chi_{\text{cal}}^2 < \chi_{h-1,0.05}^2$$

Se rechaza en caso contrario.

III.7.2 ANOVA DE UN FACTOR

Análisis de varianza (**ANOVA**, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si las medias de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

El ANOVA se basa en la descomposición de la variación total de los datos con respecto a la media global (SCT), que bajo el supuesto de que H_0 es cierta con una cierta estimación obtenida a partir de toda la información muestral, en dos partes:

1. **Variación dentro de las muestras (SCD) o Intra grupos**, cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias.
2. **Variación entre muestras (SCE) o Inter-grupos**, cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con respecto a la media global.

MARCO TEÓRICO

Las expresiones para el cálculo de los elementos que intervienen en el Anova son las siguientes:

$$\text{Media Global: } \bar{X} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}}{n}$$

$$\text{Variación Total: } SCT = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X})^2$$

$$\text{Variación Intra-grupos: } SCD = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

$$\text{Variación Inter-grupos: } SCE = \sum_{j=1}^k (\bar{X}_j - \bar{X})^2 n_j$$

Siendo x_{ij} el i -ésimo valor de la muestra j -ésima; n_j el tamaño de dicha muestra y \bar{x}_j su media. Cuando la hipótesis nula es cierta $SCE/K-1$ y $SCD/n-K$ son dos estimadores insesgados de la varianza poblacional y el cociente entre ambos se distribuye según una F de Snedecor con $K-1$ grados de libertad en el numerador y $N-K$ grados de libertad en el denominador.

Por lo tanto, si H_0 es cierta es de esperar que el cociente entre ambas estimaciones será aproximadamente igual a 1, de forma que se rechazará H_0 si dicho cociente difiere significativamente de 1.

En esta prueba las hipótesis nula y alternativa son:

$$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5 = \dots = \bar{X}_i$$

$$H_1 = \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5 \neq \dots \neq \bar{X}_i$$

Se acepta H_0 si:

$$F_{\text{cal}}^2 < F_{(h-1), (N-h), 0.05}^2$$

MARCO TEÓRICO

Se rechaza en caso contrario.

El ANOVA se basa en la comparación de la variabilidad media que hay entre los grupos con la variabilidad que hay dentro de los grupos.

Un método computacional conocido como tabla ANOVA facilita los cálculos. Se trata de disponer en forma de tabla ciertas cantidades que conducen a la obtención del F calculado, se muestra la tabla de resultados de ANOVA.

Tabla de ANOVA de un factor.

Variabilidad	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F _{cal}
Entre	$\begin{aligned} \text{SCE} &= \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \\ &= \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \end{aligned}$	$k - 1$	$\text{MSE} = \frac{SS_E}{k-1}$	$\frac{\text{MSE}}{\text{MSD}}$
Dentro	$\begin{aligned} \text{SCD} &= \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \\ &= \sum_{i=1}^k (n_i - 1) x_i^2 \end{aligned}$	$n - k$	$\text{MSD} = \frac{SS_D}{n-a}$	
Total	$\text{SCT} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x})^2$	$n - 1$		

III.7.3 COMPARACIÓN DE 2 VARIANZAS MUESTRALES

Para comparar dos varianzas muestrales se utiliza el ensayo F. La hipótesis nula es: $H_0: S_1^2 = S_2^2$, y la hipótesis alternativa $H_1: S_1^2 > S_2^2$ para el ensayo de un lado, y $H_1: S_1^2 \neq S_2^2$ para el de dos lados. Si se acepta H_0 se dice que las series son “homogéneas” u “homocedásticas”, y en el caso opuesto las series son “heterogéneas” o “heterocedásticas”. El ensayo se basa en el cálculo del estadístico F, que es el cociente entre la varianza mayor y la menor:

$$F_o = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

MARCO TEÓRICO

Como se indica en la ecuación, el estadístico F sigue una distribución asimétrica entre 0 e infinito, cuya forma depende de los grados de libertad del numerador, $t_1 = (n_1 - 1)$ y el denominador $t_2 = (n_2 - 1)$.

El nivel significativo se reduce en:

- a) Cuando aumenta F_0 alejándose de 1.
- b) Cuando aumenta t_1 , t_2 , o ambos. Es lógico puesto que al crecer los grados de libertad se tienen mejores estimaciones de las varianzas poblacionales.
- c) Cuando el ensayo es de un lado en comparación con el ensayo de dos lados, puesto que la probabilidad de que se cumpla $H_1: S_1^2 = S_2^2$ es la mitad de la probabilidad de que se cumpla $H_1: S_1^2 \neq S_2^2$.

Tanto si se emplea software, como si el ensayo se realiza utilizando tablas, es necesario elegir el nivel de significación crítico con el que se va aceptar o rechazar H_0 . Habitualmente se acepta como valor crítico $\alpha_c = 0.05$.

III.7.4 COMPARACIÓN DE 2 MEDIAS MUESTRALES

III.7.4.1 MEDIAS MUESTRALES HOMOGENEAS

El ensayo depende de que las varianzas de las dos muestras sean homogéneas o heterogéneas. Para comprobar este punto se realiza un ensayo F. Si se acepta $H_0: S_1^2 = S_2^2$, ambas varianzas pertenecen a la misma población, esto es, son estimaciones de la misma varianza conjunta o promedia, S^2 . El valor de S_c^2 se obtiene como medida ponderada, utilizando los grados de libertad de las dos series como pesos:

$$S_c^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

Es lógico que sea así, puesto que la varianza que se conoce con más grados de libertad debe influir más en el cálculo de la varianza conjunta. La ventaja de realizar

MARCO TEÓRICO

este cálculo es que aumenta el número de grados de libertad con el que se conoce la varianza común de las dos series que ahora es: $t = n_1 + n_2 - 2$.

La hipótesis nula es: $H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$

Siendo $H_1: \bar{X}_1 > \bar{X}_2$ para ensayos de un lado.

Siendo $H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$ para ensayos de dos lados

t_{calc} se calcula mediante:

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_c^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Finalmente, se busca en la tabla de Student de uno o dos lados el valor crítico de t para $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad, t_{tab} , y se compara con t_{calc} . Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$, se acepta H_0 , esto es, no se habrá demostrado que exista diferencia entre las medias para el nivel de significación exigido.

III.7.4.2 MEDIAS MUESTRALES HETEROGENEAS

Este ensayo se utiliza cuando no puede calcularse la varianza conjunta por ser las series heterogéneas. Se procede a calcular el valor de t_{calc} y luego t_{tab} . La t_{calc} se obtiene mediante la ecuación de Cochran:

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Para hallar t_{tab} es necesario calcular antes el número de grados de libertad, por eso se utiliza la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2$$

MARCO TEÓRICO

Luego de tener los grados de libertad se procede a buscar en la tabla la t_{tab} . El valor de t_{tab} es el número entero más próximo al resultado. Si $t_{calc} < t_{tab}$, se acepta la H_0 . [13]

IV MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 EQUIPOS

1. Balanza Analítica (Ohaus, EP 210)
2. Balanza Analítica (Sartorius, MCI AC 210 S)
3. Horno Mufla (Heraeus, MR 170 E)
4. Campana Extractora de Gases (Labconco)
5. Refrigeradora (Cetron, CF28** 1ABA/BTC)
6. Espectrofotómetro (Shimadzu, UV 1203)
7. Cocina de Calentamiento Eléctrico (Fisher Scientific)
8. Celdas de Vidrio



IV.2 MATERIALES

1. Desecador de Vidrio (Pyrex)
2. Cápsulas de Porcelana (Fisherbrand)
3. Pinzas de Cápsulas de Porcelana (Fisherbrand)
4. Vidrio de Reloj 4 in de diámetro(Pyrex)
5. Balones aforados de 500, 100, 50 mL (Pyrex)
6. Beaker de 100 mL (Pyrex)
7. Espátula (Fisher Scientific)
8. Pizeta de 500 mL (Fisher Scientific)
9. Pipeta Serológica de 10, 5, 1 mL
10. Pipeta Volumétrica de 10 mL

IV.3 REACTIVOS

1. Ácido Clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania)
2. Hidroxilamina (Fisher, New Jersey, USA)
3. O-Fenantrolina(Merck, Darmstadt, Alemania)
4. Acetato de Sodio Anhidro
5. Ácido Acético
6. Sal de Morhr

IV.4 SOLUCIONES

IV.4.1 SOLUCIÓN “MADRE” DE HIERRO

Disuelva 0.35121 gr de Sulfato de Hierro y Amonio en agua, agregar 2 gotas de HCl concentrado y diluir a 500 mL.

IV.4.2 SOLUCIÓN ESTANDAR DE HIERRO

Tomar 10 mL de la solución Madre de Hierro y llevarla a 500 mL.

IV.4.3 SOLUCIÓN DE HIDROXILAMINA

Disolver 10 gr de Cloruro de Hidroxilamina en agua y diluir a 100 mL. Guardar en un frasco ámbar y refrigerar.

IV.4.4 SOLUCIÓN TAMPÓN DE ACETATO

Disolver 8.3 gr de Acetato de Sodio Anhidro previamente secado a 100 °C por 1 hora en agua, agregar 12 mL de Ácido Acético y diluir a 100 mL.

IV.4.5 SOLUCIÓN DE O-FENANTROLINA

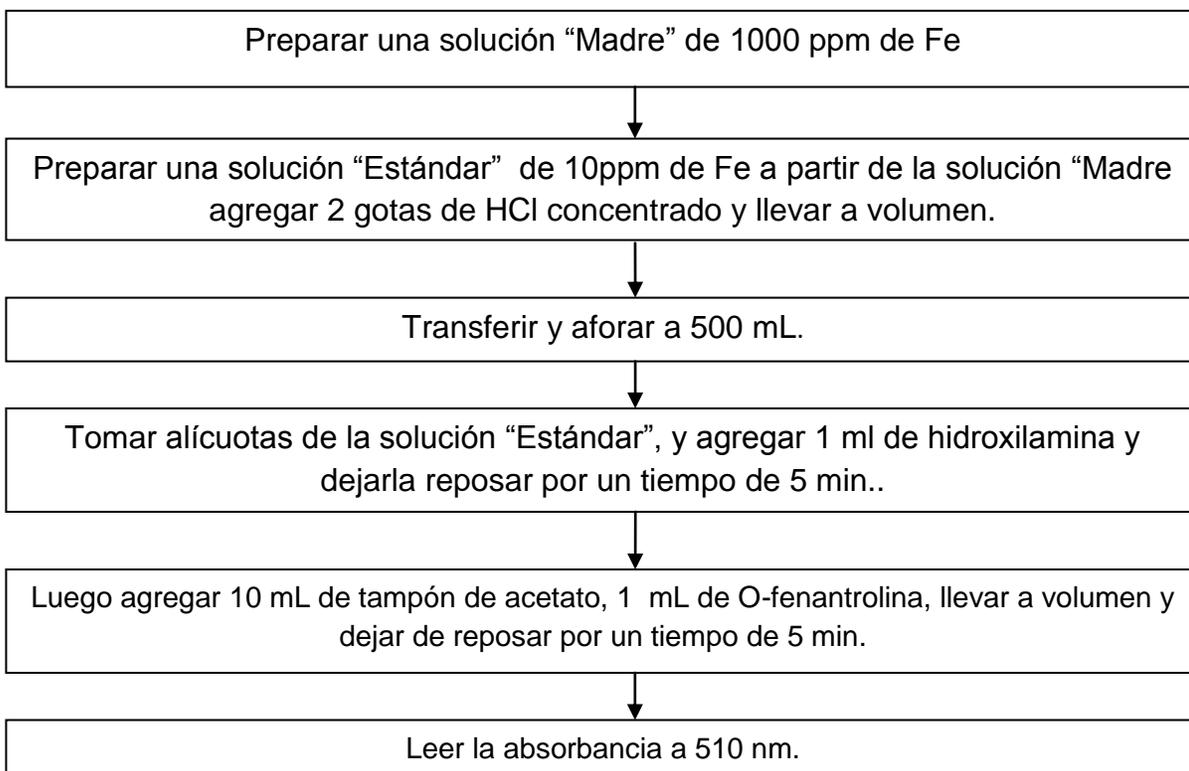
Disolver 0.1 gr de O-Fenantrolina en 80 mL de agua caliente (Temperatura de 80°C) y llevarla a volumen de 100 mL.



IV.5 MÉTODOLÓGIA

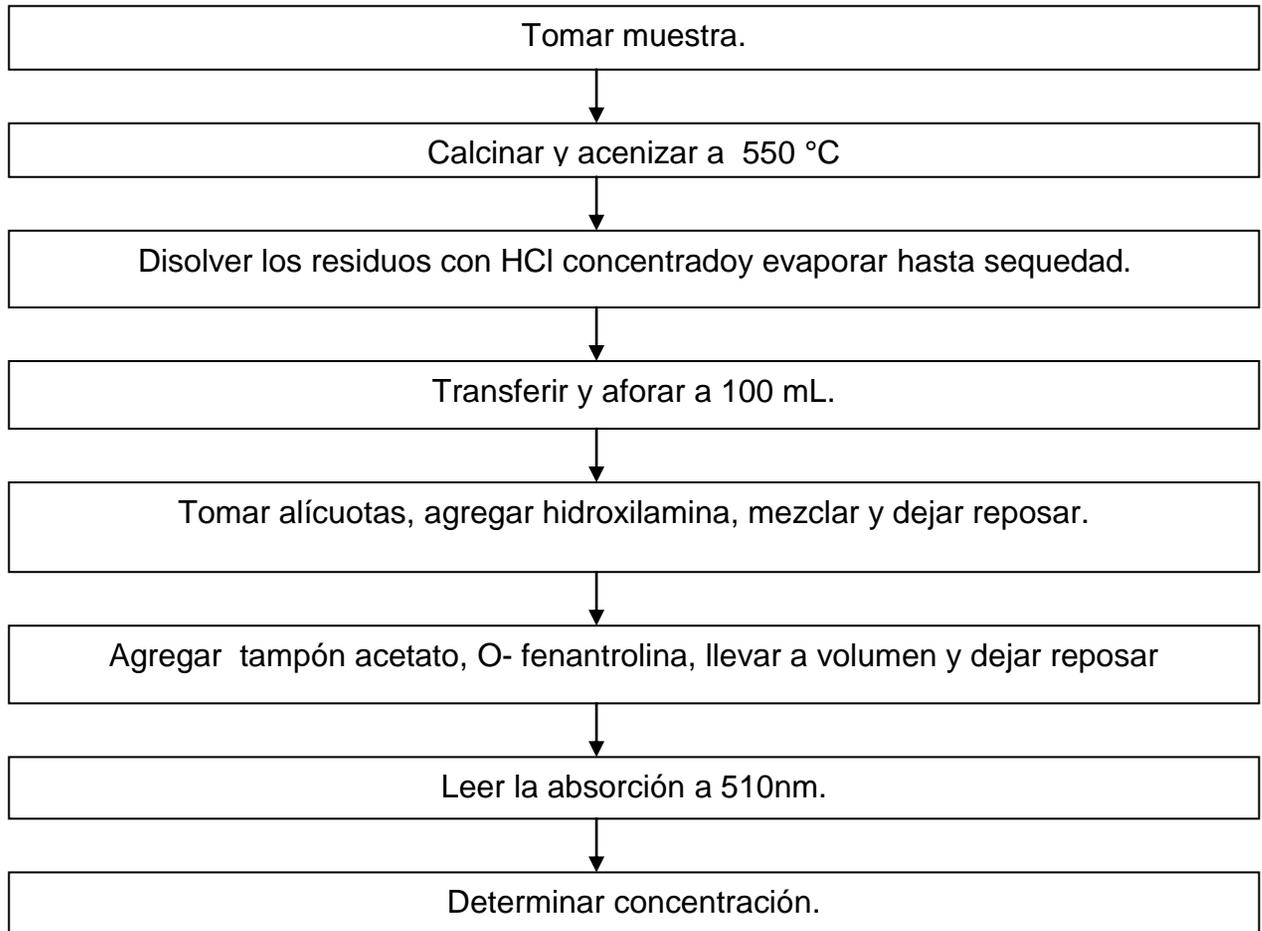
IV.5.1 DETERMINACIÓN DE HIERRO

IV.5.1.1 ESTANDARES



MATERIALES Y MÉTODOS

IV.5.1.2 MUESTRA



Calculo para determinar el contenido de hierro (Fe):

$$\text{Fe (mg / 100g)} = \frac{\text{C} \times \text{FD} \times 10}{\text{M}_m}$$

Dónde:

C = Concentración, en ppm, de hierro en la muestra.

FD = Factor de dilución.

M_m = Masa, en gramos, de la muestra.



V ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.1 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

Debido a que en Nicaragua, al igual que en muchos países latinoamericanos existe una alta tradición de consumo del frijol, siendo éste parte integrante fundamental de la dieta diaria de la población, a que en el mercado Nicaragüense y más específicamente de la ciudad de León, se expenden diversas variedades de esta leguminosa, que los volúmenes de venta y consumo son relativamente altos y que no contábamos con un estudio similar al planteado en esta monografía, decidimos elegir las muestras a ser analizadas en base a criterios puramente empíricos.

Para esto luego de diversas deliberaciones, decidimos realizar la selección de las muestras a ser estudiadas en base a los siguientes criterios empíricos:

- **Consumo**, es decir las variedades más consumidas por la población.
- **Existencia en el mercado**, esto es, las variedades con mayor oferta en el mercado local.
- **Precio**, es decir las variedades más económicas para la población.

Luego de analizar los criterios de selección antes mencionados, nos decantamos por 3 variedades, las que adquirimos en el Mercado Central de la Ciudad de León.

Las variedades seleccionadas y algunas de sus características se muestran en la tabla V.1

Tabla V.1 Muestras de frijoles seleccionados

Nombre común	Nombre científico	Familia
Frijol rojo	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Leguminosa</i>
Frijol negro	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Leguminosa</i>
Frijol blanco	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Leguminosa</i>

V.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES DEL MÉTODO

Los parámetros experimentales del método fueron:

1. Rango lineal
2. Linealidad
3. Repetibilidad y reproducibilidad
4. Efecto matriz
5. Porcentaje de recuperación
6. Límites de detección y cuantificación
7. Incertidumbre de los resultados

La obtención de estos parámetros fue realizada posteriormente a la optimización de las condiciones experimentales del método en relación a nuestras muestras de estudio.

Para estos nos basamos en estudios anteriores y en formatos obtenidos de la bibliografía relativos a la validación de métodos analíticos.

En la obtención de los parámetros experimentales, empleamos en la mayoría de los casos más de una forma para obtenerlos, esto con el fin de tener suficientes elementos que confirmaran nuestras apreciaciones y a su vez proporcionaran elementos que podrían ser utilizados para futuros estudios relacionados con la temática del presente estudio.

Los parámetros experimentales obtenidos así como un breve análisis de sus resultados se muestran a continuación.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.1 RANGO LINEAL

Se considera al rango lineal como el rango de trabajo en el cual se puede analizar un determinado analito en condiciones experimentales, con suficiente evidencia de que no se está cometiendo un error en el análisis.

Considerando experiencias anteriores, nuestro rango lineal fue estudiado en un intervalo de concentraciones entre 0 a 2ppm de Fe, para esto preparamos diversos estándares de concentración conocida y obtuvimos sus lecturas de absorbancia. Restamos las lecturas de los estándares a la lectura del blanco, y obtuvimos la relación absorbancia/concentración de estas diferencias. Posteriormente obtuvimos la mediana de la relación absorbancia/concentración, y los valores de +/- 5% de ésta. Estos valores fueron considerados como los límites central, superior e inferior en el grafico obtenido de absorbancia/concentración vs concentración. Si los puntos de este grafico se salen de los límites de control se considera que este no pertenece al rango lineal. En la figura V.1, se muestran los resultados para los cálculos mencionados.

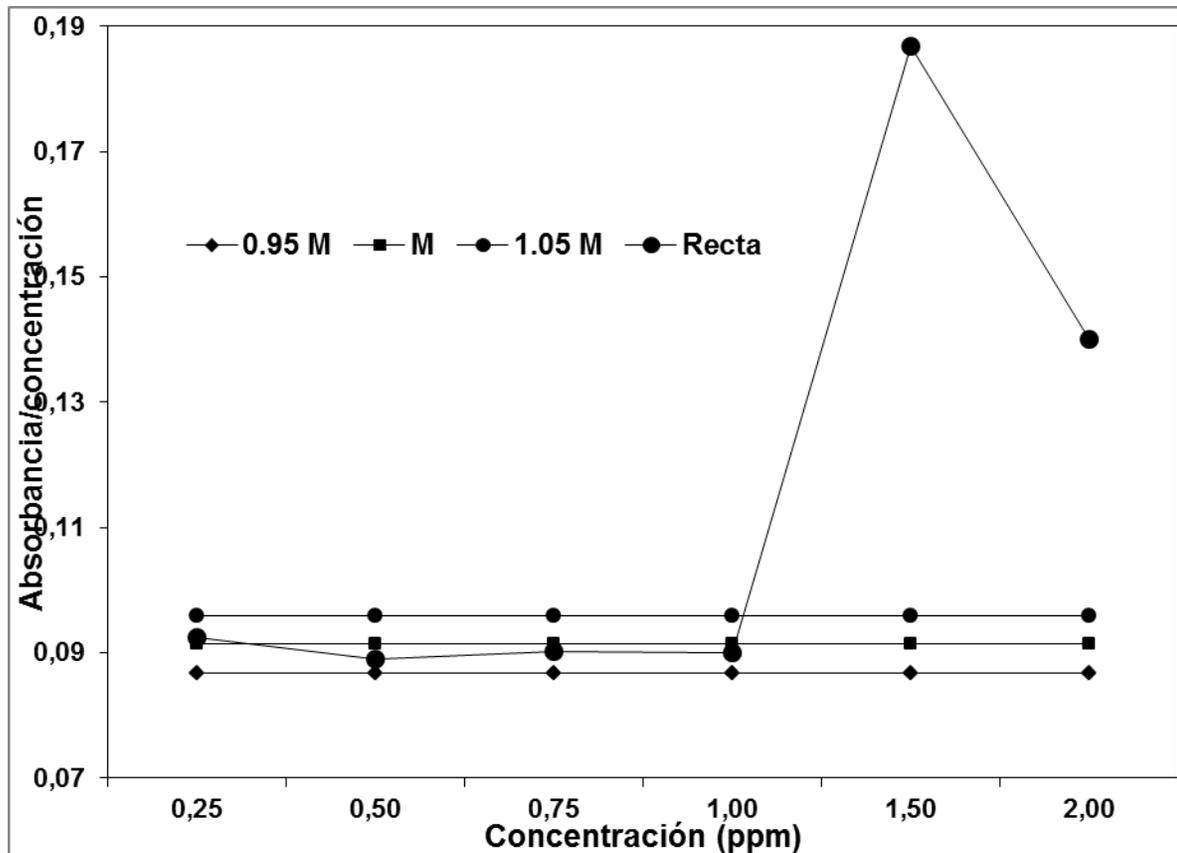


Fig. V.1 Relación absorbancia/concentración vs. Concentración.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la figura V.1, el rango lineal obtenido se encuentra en el intervalo de concentraciones de 0 a 1ppm, estando los puntos de 1.5 y 2.0 ppm, fuera de éste rango. Por lo que todos los estudios posteriores deben realizarse en este intervalo lineal.

V.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para evaluar la linealidad se efectuó una curva de calibración normal de 5 puntos en un rango de concentración de 0 a 1 ppm del estándar de Fe. Realizando lecturas por 4 días consecutivos. Los resultados fueron evaluados mediante las 5 formas siguientes:

1. Prueba de contraste de correlación
2. Prueba de falta de ajuste
3. Porcentaje de linealidad
4. Anova
5. Coeficientes de determinación
6. Gráficos de residuales

V.2.2.1 PRUEBA DE CORRELACIÓN

La prueba de correlación es una de las formas de establecer el comportamiento lineal entre dos variables. Para realizar esto se calcula un estadístico t y se compara con un valor de t tabulado a un nivel de confianza de 95% y n-2 grados de libertad, esto porque estamos considerando dos variables (x e y). El estadístico t se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Dónde:

- r: es el coeficiente de determinación
- n: son los puntos de la recta

Las hipótesis nula y alternativa planteadas fueron:

- H₀: No existe linealidad entre x e y
- H₁: Existe linealidad entre x e y

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Si $t_{cal} > t_{tab}$ se rechaza H_0 y se concluye que existe correlación lineal entre los datos x e y . En la tabla V.2, se muestran los resultados obtenidos para las rectas de calibración obtenidos en 4 días de estudio

Tabla V.2 Resultados de los cálculos del estadístico t para las rectas de calibración

Recta	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	22.20	58.54	33.09	46.19
2	36.64	48.16	55.05	68.74
3	48.35	26.08	49.43	50.94
4	40.78	64.08	74.15	18.24
5	40.90	47.84	35.47	63.22

Tal y como se observa en la Tabla V.2, los valores de t_{cal} para todas las rectas en los días de estudio son mayores que el valor de t_{tab} ($t(0.05, 3) = 3.18$), por lo que en todos los casos rechazamos la hipótesis nula y concluimos que existe linealidad en todas las rectas estudiadas.

V.2.2.2 PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE

La prueba de falta de ajuste o “Lack of fit”, es otra de las formas de confirmar el comportamiento lineal entre dos variables. Para realizar esto se calcula un estadístico F y se compara con un valor de F tabulado a un nivel de confianza de 95% y $n - r - 1$, $r - 1$ grados de libertad, (r son las réplicas y n los puntos de la recta). El estadístico F se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$F_{LOF} = \frac{S_{LOF}^2}{S_{PE}^2}$$

S_{LOF}^2 , S_{RES}^2 y S_{PE}^2 se calculan de la siguiente forma:

$$S_{LOF}^2 = \frac{(n - 2)S_{RES}^2 - (r - 1)S_{PE}^2}{(n - 2) - (r - 1)}$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$S_{RES}^2 = \frac{\sum(\hat{y}_i - y_i)^2}{(n - 2)}$$

$$S_{PE}^2 = \frac{\sum S_i^2}{h}$$

Las hipótesis nula y alternativa planteadas fueron:

H_0 : Existe ajuste lineal entre x e y

H_1 : No existe ajuste lineal entre x e y

Si $F_{LOF} > F_{(0.05; n-r-1; r-1)}$, se acepta H_0 y se concluye que existe correlación lineal entre los datos x e y. En la tabla V.3, se muestran los resultados obtenidos para las rectas de calibración obtenidos en 4 días de estudio.

Tabla V.3 Resultados de los cálculos del estadístico F_{LOF} para las rectas de calibración

Recta	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	4.49	12.13	8.50	22.27
2	6.89	0.92	18.40	-0.75
3	3.38	26.04	17.60	5.77
4	10.34	14.40	3.18	43.53
5	0.21	1.20	51.20	2.51

Tal y como se observa en la Tabla V.3, los valores de F_{LOF} calculado para todas las rectas en los días de estudio son menores que el valor de F_{tab} ($t(0.05,1,2) = 18.51$), por lo que en todos los casos aceptamos la hipótesis nula y concluimos que existe ajuste lineal en todas las rectas estudiadas.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.2.3 PORCENTAJE DE LINEALIDAD

La prueba de porcentaje de linealidad, es otra de las formas de confirmar el comportamiento lineal entre dos variables. El estadístico del porcentaje de linealidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%Linealidad = \left(1 - \frac{S_{b_1}}{b_1}\right) \times 100$$

Dónde:

S_{b_1} : Es la desviación estándar de la pendiente

b_1 : Es la pendiente de la recta

S_{b_1} , $S_{y/x}$ y b_1 se calculan de la siguiente forma:

$$S_{b_1} = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}}$$

$$b_1 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

En este caso cuanto más cercano se encuentre del 100% mayor será la linealidad de la recta. En la tabla V.4, se muestran los resultados obtenidos para las rectas de calibración obtenidos en 4 días de estudio.

Tabla V.4 Resultados de los cálculos de % de Linealidad para las rectas de calibración.

Recta	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	95.50	98.29	96.95	97.77
2	97.27	97.92	98.18	98.94
3	97.90	96.16	97.98	98.04
4	97.55	98.44	98.65	95.02
5	97.47	97.67	97.18	98.55

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la Tabla V.4, la mayoría de los valores obtenidos de porcentajes de linealidad son mayores o iguales al 97%, salvo en los casos de las rectas primera del primer día (95.50%) y cuarta del cuarto día (95.02%), aunque estas no fueron muy diferentes, esta situación creemos que se debe a pequeñas desviaciones en la obtención de estas rectas.

V.2.2.4 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

La prueba de análisis de varianza (ANOVA), es también una forma de confirmar el comportamiento lineal de una recta de calibración. El estadístico F del análisis de varianza se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$F_{cal} = \frac{\frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{(n-1)-(n-2)}}{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}}$$

Las hipótesis nula y alternativa planteadas fueron:

H_0 : No hay linealidad del modelo

H_1 : Hay linealidad del modelo

Si $F_{cal} > F_{(0.05; n-1-n-2; n-2)}$, la correlación lineal es significativa y no puede atribuirse a la casualidad, esto es se acepta la H_1 y se rechaza la H_0 y el modelo de las rectas es lineal. Los resultados del ANOVA se muestran en la tabla V.5.

Tabla V.5 Resultados de los cálculos del análisis de varianza (ANOVA) para las rectas de calibración

Recta	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	492.95	3427.47	1076.84	2007.71
2	1342.50	2319.78	3030.62	8890.03
3	2274.83	679.91	2443.18	2595.20
4	1662.72	4105.79	5498.70	403.85
5	4800.83	1849.00	1258.15	4731.99

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la Tabla V.5, los valores de F_{cal} para todas las rectas en los días de estudio son mayores que el valor de F_{tab} ($F_{(0.05, 1, 3)} = 10.13$), por lo que en todos los casos aceptamos la hipótesis alternativa y concluimos que existe linealidad del modelo en todas las rectas estudiadas.

V.2.2.5 COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

La prueba del coeficiente de determinación, es otra de las formas de confirmar el comportamiento lineal entre dos variables. Para que se considere que una recta se ajusta a un modelo lineal el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.99. Los coeficientes de determinación fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$r^2 = \frac{(\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Los resultados se muestran en la tabla V.6.

Tabla V.6 Resultados de los cálculos del coeficiente de determinación para las rectas de calibración

Recta	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	0.9940	0.9991	0.9972	0.9985
2	0.9978	0.9987	0.9990	0.9997
3	0.9987	0.9956	0.9988	0.9988
4	0.9982	0.9993	0.9995	0.9926
5	0.9981	0.9984	0.9976	0.9994

Tal y como se observa en la Tabla V.6, los valores de los coeficientes de determinación de todas las rectas en los días de estudio son mayores que 0.99, por lo que podemos decir que todas se ajustan a un modelo lineal.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.2.6 GRAFICO DE RESIDUALES

Finalmente la observación de los gráficos de los residuales nos puede proporcionar una idea del comportamiento de una recta de calibración. Si los residuos de una recta se distribuyen aleatoriamente en el gráfico, se considera que el modelo sigue un comportamiento lineal, en caso contrario se considera que no lo sigue.

Los residuos de las rectas de calibración fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i$$

Donde

\hat{y}_i es el valor predicho de y_i

Una vez obtenidos los residuos se procedió a graficarlos en función de la concentración para determinar el tipo de comportamiento de las rectas. En la figura V.2, se muestra los gráficos de residuales para las rectas primera de todos los días del estudio.

Una observación pormenorizada de los gráficos de residuales contenidos en la figura V.2, nos permite establecer que existe aleatoriedad de los residuales en todos los gráficos, igual situación encontramos con los restantes gráficos de las rectas de todos los días, lo que no presentamos en esta monografía por cuestiones de espacio.

El comportamiento de los residuales de todos los gráficos obtenidos nos permite establecer que todas las rectas presentan comportamiento lineal, lo cual está en concordancia con todos los resultados anteriores.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

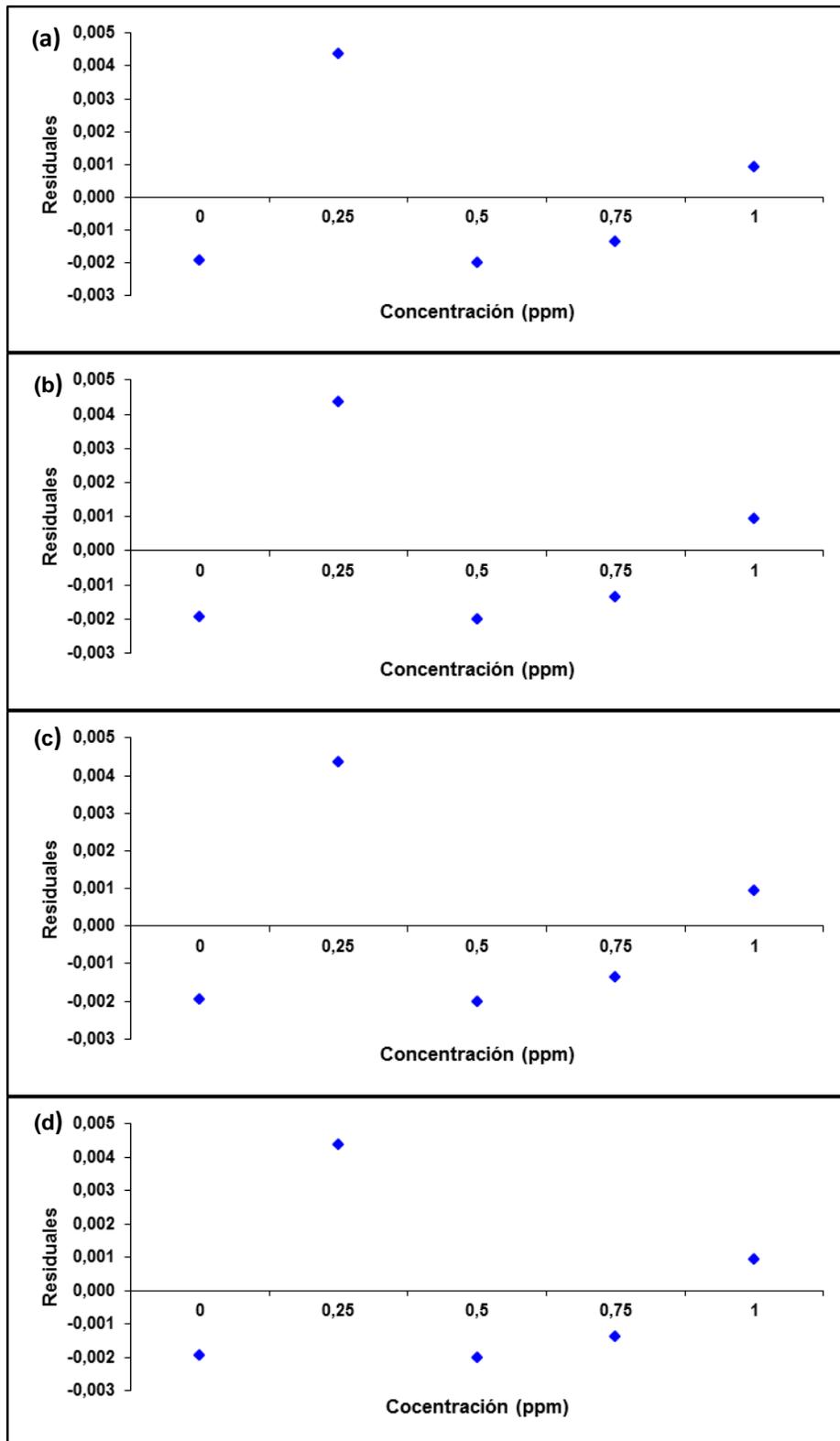


Figura V.2 Grafico de residuales de las primeras rectas de los días 1 (a), 2 (b), 3(c) y 4(d) del estudio.

V.2.2.7 CONTROL DE CALIDAD DE LAS RECTAS DE CALIBRACIÓN

Para determinar las diferencias tanto del intercepto (b_0) como de la pendiente (b_1), elaboramos una carta de control bidimensional ubicando como ordenada el intercepto y como abscisa la pendiente. Para esto inicialmente elaboramos una recta de calibración de 7 puntos y con los coeficientes del modelo y sus intervalos de confianza se elaboró la carta de control. Debido a que los parámetros b_0 y b_1 están correlacionados, la carta de control más precisa debe ser una elipse. Los valores de b_0 y b_1 de las rectas de calibración realizadas para el estudio de la repetibilidad del método durante 4 días y realizadas 5 veces cada día fueron ubicados en el gráfico de control de calidad. Partimos del presupuesto que los valores que se ubican en el interior de la elipse están bajo control y cuanto más cercanos se encuentran los puntos entre sí, mayor es la repetibilidad de las mediciones y las rectas se encuentran bajo control. En la figura V.3, se muestran los resultados obtenidos.

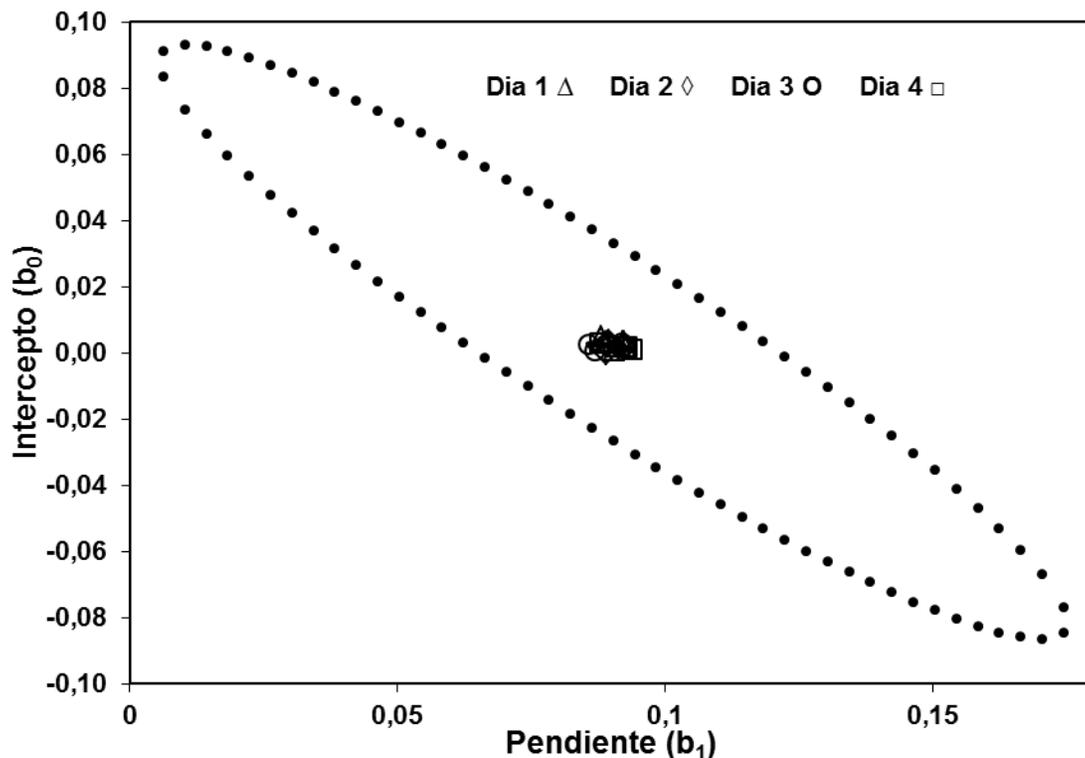


Figura V.3 Gráfico control de calidad de la recta de calibración.

Tal y como se observa en la figura VI.3, todas las rectas utilizadas en el estudio de repetibilidad por 4 días estaban bajo control, lo que nos indica que estas son bastante similares y que no es necesario realizarlas diariamente, siendo suficiente realizar una y utilizarla sus resultados por un período de 4 días.

V.2.3 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

El estudio del efecto matriz se realiza con el fin de determinar la existencia de interferencias en la matriz que pueden afectar la determinación del analito. Existen dos tipos de efecto matriz:

- **Intensificador** si las interferencias producen aumento en la señal del analito adicionado en la matriz y la pendiente de la recta mayor que la de la recta realizada con calibración normal.
- **Depresor** si las interferencias de la matriz producen disminución en la señal del analito adicionado en la matriz y la pendiente de la recta es menor que la de la recta realizada con calibración normal.

Para realizar el estudio del efecto matriz realizamos rectas de adición patrón preparando disoluciones de las muestras, de las que tomamos alícuotas definidas, a las que le adicionamos cantidades crecientes de un estándar de hierro en similares condiciones que las tomadas para elaborar una recta de calibración normal. De esta forma obtuvimos 3 rectas de adición patrón para las muestras de frijoles blancos (M1), negros (M2) y rojos (M3) y una recta de calibración normal. Los parámetros de las 4 rectas se muestran en la tabla V.7.

Tabla V.7 Parámetros de las rectas de adición patrón de las muestras (RAP) y de calibración normal (RCN) realizadas.

Parámetros	RCN	RAPM1	RAPM2	RAPM3
b₁	0.10947	0.10427	0.10267	0.10480
b₀	0.00973	0.07100	0.06427	0.05980
r²	0.99815	0.99982	0.99995	0.99994
S_{Y/X}	0.00215	0.00063	0.00032	0.00037

El efecto matriz fue estudiado mediante:

1. Comparación directa de la pendiente de la recta de adición patrón entre la pendiente de la recta de calibración normal.
2. Aplicación de una prueba de comparación estadística de las pendientes de las rectas de adición patrón respecto a la pendiente de la recta de calibración normal.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.3.1 COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES DE LAS RECTAS DE ADICIÓN PATRÓN RESPECTO A LA PENDIENTE DE LA RECTA DE CALIBRACIÓN NORMAL.

La comparación de las rectas de adición patrón respecto a la pendiente de la recta de calibración normal, la realizamos empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto Matriz} = \frac{b1_{(RAP)}}{b1_{(RCN)}}$$

De esto podemos deducir tres posibles situaciones:

1. Que, $b1_{(RAP)} = b1_{(RCN)}$, en este caso no existe efecto matriz y el resultado de la división es igual a 1. El gráfico obtenido mostrará que las dos rectas se ubican paralelas entre sí.
2. Que, $b1_{(RAP)} > b1_{(RCN)}$, en este caso existe efecto matriz intensificador y el resultado de la división es mayor que 1. El gráfico obtenido mostrará que la dos recta de adición patrón no son paralelas entre sí, observándose alejamiento positivo de la recta de adición patrón respecto a la recta de calibración normal.
3. Que, $b1_{(RAP)} < b1_{(RCN)}$, en este caso existe efecto matriz depresor y el resultado de la división es menor que 1. El gráfico obtenido mostrará que la dos recta de adición patrón no son paralelas entre sí, observándose alejamiento negativo de la recta de adición patrón respecto a la recta de calibración normal.

Suele suceder sin embargo que, las pendientes de las rectas de calibración de adición patrón y de calibración normal son similares entre si y en este caso se suele observar en el gráfico que las rectas son paralelas entre sí, en este caso existe un pequeño efecto matriz, que puede ser despreciable en función de los resultados de los análisis realizados. En este caso se suele determinar el porcentaje de efecto matriz, mediante la siguiente ecuación.

$$\% EM = \left[1 - \left(\frac{b1_{(RAP)}}{b1_{(RCN)}} \right) \right] \times 100$$

En la tabla V.8, se muestran los resultados del cálculo del efecto matriz y del porcentaje encontrado.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla V.8 Efecto matriz (EM) y porcentaje de efecto matriz (%EM).

Relación	EM	%EF
$b1_{(RCN)} \text{ vs } b1_{(RAPM1)}$	0.95	4.75
$b1_{(RCN)} \text{ vs } b1_{(RAPM2)}$	0.94	6.21
$b1_{(RCN)} \text{ vs } b1_{(RAPM3)}$	0.96	4.26

Tal y como se observa en la tabla V.8, existe un pequeño efecto matriz depresor en las muestras analizadas, siendo éste menor del 6.5%, lo cual se corresponde con lo observado la figura V.4, en la cual se muestra que las rectas de adición patrón de las muestras analizadas tienen un comportamiento paralelo al de la recta de calibración normal. Esto nos induce a pensar que el efecto matriz, es muy pequeño y casi no tiene efecto en el análisis de las muestras tanto si lo realizamos con la técnica de adición patrón como con la técnica de calibración normal.

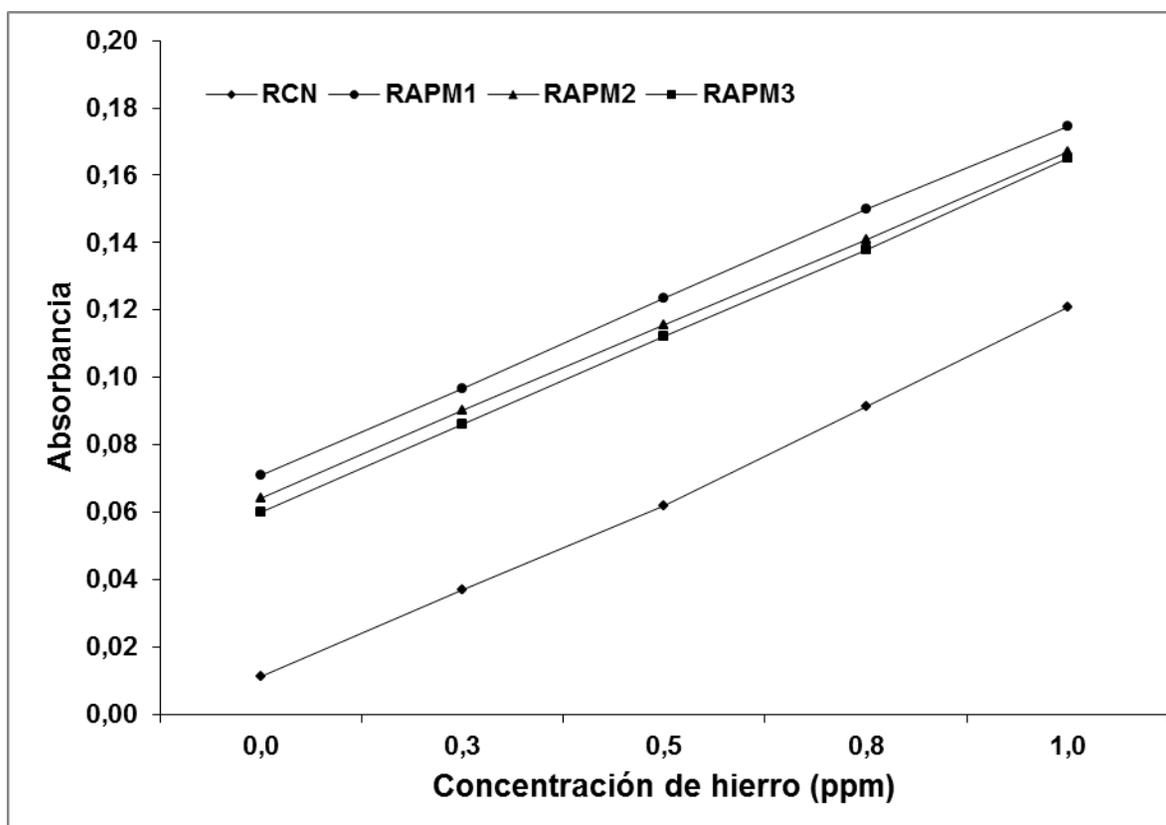


Figura V.4 Gráfico control de calidad de la recta de calibración.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.3.2 COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS PENDIENTES DE LAS RECTAS DE ADICIÓN PATRÓN Y CALIBRACIÓN NORMAL.

Para este fine aplicamos una prueba estadística de t de student, previo a la cual fue necesario realizar una comparación de varianzas esto con el fin de poder decidir de la forma de cálculo de la t. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H₀: Las pendientes son iguales

H₁: Las pendientes son diferentes

Para el caso de que las varianzas son homogéneas el t a ser calculado es:

$$t_{cal} = \frac{|b1_{RCN} - b1_{RAP}|}{\sqrt{S_{b_{RCN}}^2 + S_{b_{RCN}}^2}}$$

Para el caso de que las varianzas son heterogéneas el t a ser calculado es:

$$t_{cal} = \frac{b1_{RCN} + b1_{RAP}}{S_{b_{RCN}}^2 + S_{b_{RCN}}^2}$$

Si $t_{cal} < t_{(0.05; n-1)}$, las pendientes son iguales y se acepta H₀, en caso contrario se rechaza. Al realizar el análisis de las varianzas de las rectas de calibración normal y de adición patrón, determinamos que las varianzas en todos los casos eran homogéneas por lo que aplicamos la fórmula de cálculo de t para este caso, los resultados se muestran en la tabla V.9.

Tabla V.9 Valores de t calculados para la relación de pendientes.

Relación	t _{cal}	t _(0.05;n1+n2-4)
b1 _(RCN) vs b1 _(RAPM1)	1.995	2.447
b1 _(RCN) vs b1 _(RAPM2)	1.989	
b1 _(RCN) vs b1 _(RAPM3)	1.854	

Los resultados mostrados en la tabla V.9, muestran que los valores de t calculado en todos los casos es menor que el t tabulado, por lo que aceptamos H₀ y establecemos que las pendientes son iguales, y no hay efecto matriz en ninguno de los casos.

V.2.4 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Tal y como hemos definido en el marco teórico la repetibilidad es la precisión obtenida analizando alícuotas de una muestra homogénea, sometidas independientemente a todo el proceso analítico de forma independiente, en las condiciones más favorables: mismo método de medida, mismo analista, mismo instrumento de medida usado en las mismas condiciones, mismo laboratorio, repetidas en un corto período de tiempo.

Por otra parte la reproducibilidad como precisión intermedia es llamada también reproducibilidad intralaboratorio, esta se determina comparando los resultados de precisión de un método a lo largo del tiempo en un mismo laboratorio, su finalidad es verificar que un mismo método en el mismo laboratorio originará los mismos resultados una vez que ha sido desarrollado.

V.2.4.1 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD INSTRUMENTAL

Para realizar el estudio de repetibilidad y precisión intermedia instrumental elaboramos cinco rectas de calibración en un intervalo de tiempo definido, estas las utilizamos para analizar un estándar de 0.5 ppm de hierro por triplicado, por cuatro días consecutivos, obteniendo quince lecturas por día para un total 60 lecturas. El estándar fue obtenido de una solución madre de 20 ppm y fue preparado diariamente. La media de los resultados obtenidos se muestra en la tabla V.10.

Tabla V.10 Resultados del análisis de estándar de 0.5 ppm.

Estándar	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4
0.5 ppm	0.466	0.489	0.515	0.488
	0.463	0.501	0.486	0.499
	0.493	0.509	0.499	0.493
	0.450	0.493	0.485	0.507
	0.493	0.489	0.481	0.490

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Debido a que para realizar el estudio de la repetibilidad y precisión intermedia es necesario realizar un análisis de varianza (ANOVA) es necesario previamente determinar la homogeneidad de las varianzas, esto es que no existen diferencias significativas entre los resultados de cada día. Para esto aplicamos la prueba estadística de Bartlett para comparar las varianzas. Los resultados del test de Bartlett se muestran en la tabla V.11.

Tabla V.11 Resultados del Test de Bartlett de los resultados del análisis del estándar de 0.5 ppm.

Parámetro	Estándar 0.5
C	2.083
S^2_{conj}	0.000
X^2_0	2.047
$X^2_{(0.05,3)}$	7.815

Tal y como se observa en la tabla V.11, el valor de X^2_0 es menor que el valor de X^2_{tab} , por lo tanto las varianzas son homogéneas y se puede aplicar ANOVA a los resultados obtenidos. Una vez determinada la condición anterior aplicamos ANOVA de un factor a los resultados obtenidos, lo que se muestra en la Tabla V.12.

Tabla V.12 Resultados de ANOVA aplicado a los resultados del análisis del estándar de 0.5 ppm.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	0.002	3	0.0006	3.50	3.24
Dentro de los grupos	0.003	16	0.0002		
Total	0.005	19			

La repetibilidad de las medidas se determina a partir del valor del Cuadrado Medio dentro de los grupos y constituye la varianza de la repetibilidad. Para calcular el valor de la desviación estándar relativa de la repetibilidad (DER^r) es necesario calcular la raíz cuadrada de esta varianza y dividirla entre la media total de los resultados obtenidos multiplicándola por cien, tal y como se muestra a continuación.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$S^r = \sqrt{CM_{Dentro}}$$

$$DER^r = \frac{S^r}{\bar{x}_{Total}} \times 100$$

Se ha establecido en la bibliografía que la **DER^r** debe ser menor o igual al 20%, para tener una buena repetibilidad, el resultado obtenido fue de **2.69%**, por lo que la repetibilidad instrumental es excelente.

La precisión intermedia la calculamos a partir de los cuadrados medios entre y dentro de los grupos, obteniendo una varianza neta entre los grupos, la que se calcula de la siguiente forma:

$$S_{neta}^2 = \frac{CM_{Entre} - CM_{Dentro}}{n}$$

Posteriormente se calcula la varianza de la reproducibilidad o precisión intermedia de la siguiente forma:

$$S_R^2 = S_{Neta}^2 + CM_{Dentro}$$

Posteriormente calculamos la desviación estándar de la reproducibilidad o precisión intermedia y finalmente calculamos la **DER^R**, de la siguiente forma:

$$S^R = \sqrt{S_R^2}$$

$$DER^R = \frac{S^R}{\bar{x}_{Total}} \times 100$$

Se ha establecido en la bibliografía que la **DER^R** debe ser menor o igual al 30%, para tener una buena reproducibilidad o precisión intermedia, el resultado obtenido fue de

ANÁLISIS DE RESULTADOS

2.86%, por lo que la reproducibilidad o precisión intermedia instrumental es excelente.

Cabe mencionar que alguna de la bibliografía consultada se recomienda calcular los valores de DER^R y DER^r , utilizando la ecuación de Horwitz, a la concentración utilizada en los estudios, en este caso la ecuación utilizada para el cálculo de la DER^R según Horwitz es la siguiente:

$$DER^R = 2^{(1-0.5 \cdot \log C)}$$

Dónde:

Log C es el logaritmo de la concentración analizada

Para el cálculo de la DER^r se utilizó la siguiente ecuación:

$$DER^r = 0.66 \times DER^R$$

De esta forma encontramos que DER^R fue de **12.60%** y DER^r fue de **8.60%**, respectivamente. Estos valores luego fueron comparados con los valores de DER^R y DER^r obtenidos con el ANOVA, usando el parámetro Horrat, que se calcula de la siguiente forma:

$$Horrat = \frac{DER_{ANOVA}^R}{DER_{Horwitz}^R}$$

$$Horrat = \frac{DER_{ANOVA}^r}{DER_{Horwitz}^r}$$

En ambos casos si el parámetro de Horrat es menor de 2, indica que la reproducibilidad y la repetibilidad son buenas. Una vez obtenidas los valores de DER^R y DER^r tanto por el ANOVA como por la ecuación de Horwitz, calculamos los parámetros de Horrat encontrando que para la reproducibilidad o precisión intermedia fue de **0.23** y para la repetibilidad fue de **0.32**, demostrando que tanto la repetibilidad como la reproducibilidad o precisión intermedia instrumental es excelente.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con el fin de comprobar la aleatoridad de los resultados obtenidos en la repetibilidad del estándar de 0.5 ppm, elaboramos un gráfico de control, en el que graficamos los límites superiores e inferiores y la media de los resultados, reflejando los media de los resultados obtenidos cada día. Las ecuaciones de cálculo de los límites del grafico de control fueron las siguientes:

$$3S + \bar{X} ; 2S + \bar{X} ; \bar{X} ; 3S - \bar{X} ; 2S - \bar{X}$$

En la figura V.5, se muestra el gráfico de control del estándar de 0.5 ppm.

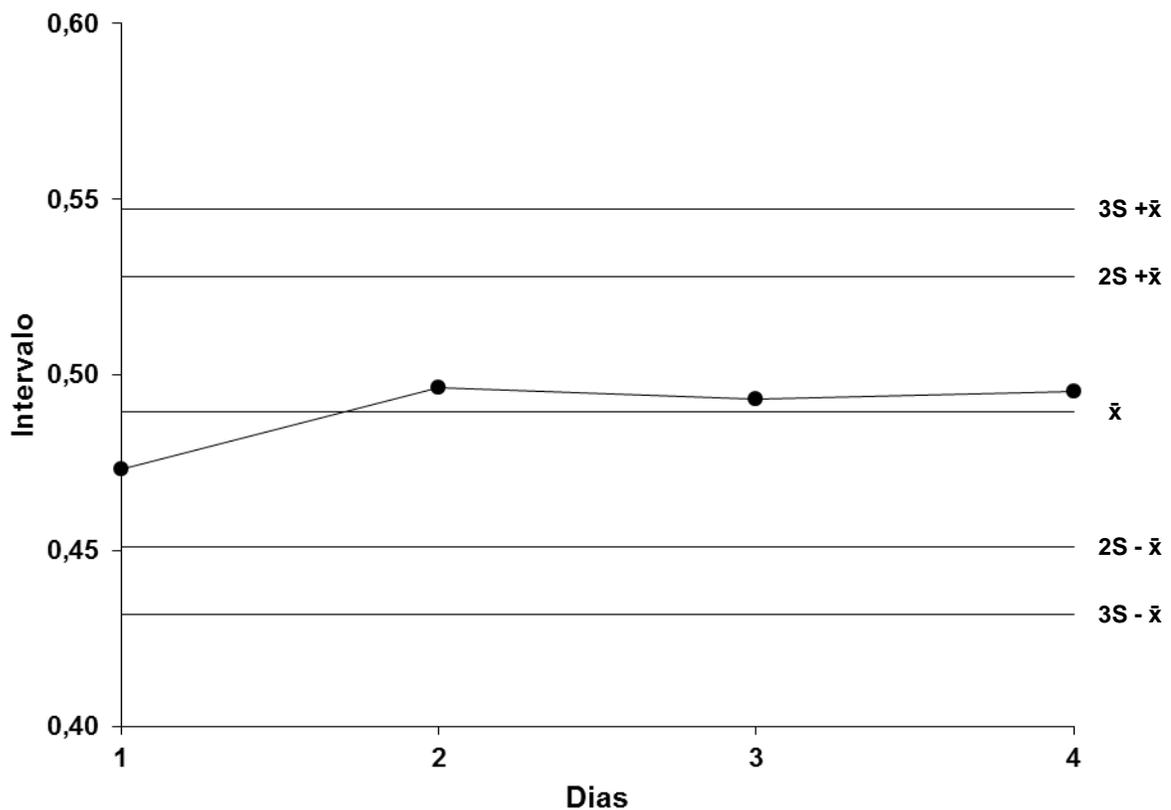


Figura V.5 Grafico de control del estándar de 0.5 ppm de hierro.

Tal y como se observa en el gráfico de control los resultados de las lecturas del estándar de 0.5 ppm de hierro, se encuentran bajo control, permaneciendo en los 3 últimos días del estudio muy cercano a la media de los resultados.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Finalmente con el fin de verificar que no hay diferencias significativas entre las medias de cada día de estudio, procedimos a graficar los intervalos de confianza calculando para esto las siguientes ecuaciones:

$$\text{Limite superior: } \bar{X} + t_{(0.05, n-1)} S$$

$$\text{Limite medio: } \bar{X}$$

$$\text{Limite inferior: } \bar{X} - t_{(0.05, n-1)} S$$

Los resultados obtenidos se muestran en la figura V.6

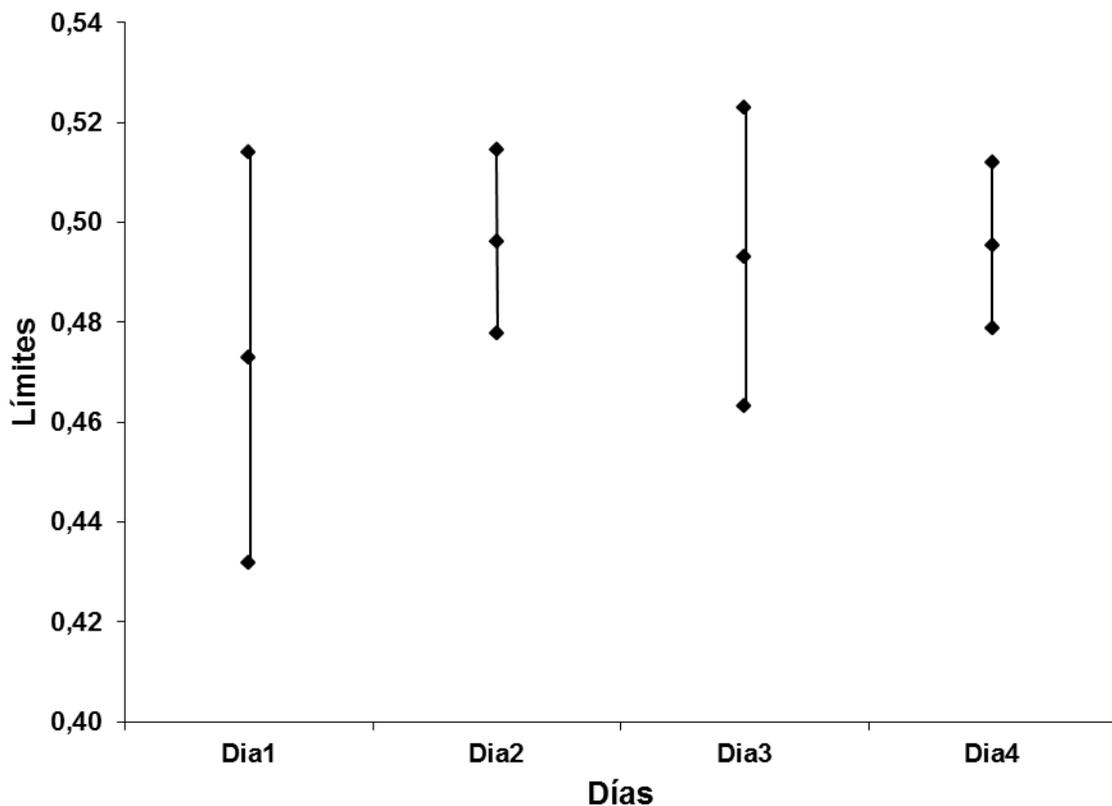


Figura V.6 Grafico de límites de confianza del estándar de 0.5 ppm de hierro.

Tal y como se puede observar en la Figura V.6, en todos los días encontramos puntos comunes, por otra parte se pudo comprobar que la media de los resultados

ANÁLISIS DE RESULTADOS

abarca o toca a todos los intervalos, por lo que podemos considerar que los resultados se encuentran bajo control.

V.2.4.2 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Para realizar el estudio de repetibilidad y precisión intermedia del método elaboramos cinco rectas de calibración en un intervalo de tiempo definido, estas las utilizamos para analizar las muestras de frijoles (Blanco, Negro y Rojo) por triplicado, por cuatro días consecutivos, obteniendo quince lecturas por día para un total 60 lecturas de cada una de las muestras. La media de los resultados obtenidos se muestra en las tablas V.13 (M1), V.14 (M2), V.15 (M3).

Tabla V.13 Resultados del análisis de la muestra 1(frijol blanco)

Muestra	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4
M1	4.856	4.684	5.313	6.456
	4.920	4.881	5.358	6.517
	4.678	4.783	5.202	6.356
	4.668	4.567	5.501	6.641
	4.786	4.891	5.419	6.747

Tabla V.14 Resultados del análisis de la muestra 2(frijol negro)

Muestra	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4
M2	2.814	2.170	3.087	5.022
	3.111	2.202	3.022	4.277
	3.103	3.508	3.251	4.242
	3.295	3.224	3.179	4.666
	3.093	3.066	3.099	4.688

Tabla V.15 Resultados del análisis de la muestra 3(frijol rojo)

Muestra	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4
M3	4.024	3.534	4.085	5.452
	3.763	3.542	4.190	5.650
	3.853	3.433	4.046	5.117

ANÁLISIS DE RESULTADOS

	3.801	3.522	5.065	5.653
	3.756	3.723	4.072	5.398

Al igual que en el caso del estándar de 0.5 ppm, realizamos un análisis de varianza (ANOVA), previa determinación de la homogeneidad de las varianzas, mediante la prueba estadística de Bartlett. Los resultados de éste test se muestran en la tabla V.16

Tabla V.16 Resultados del Test de Bartlett de los resultados del análisis de las muestras 1, 2 y 3.

Parámetro	M1	M2	M3
C	2.083	2.083	2.083
S^2_{conj}	0.017	0.129	0.066
X^2_0	0.302	6.558	5.156
$X^2_{(0.05,3)}$	7.815	7.815	7.815

Tal y como se observa en la tabla V.16, el valor de las muestras de X^2_0 son menores que el valor de X^2_{tab} , por lo tanto las varianzas son homogéneas y se puede aplicar ANOVA a los resultados obtenidos. Una vez determinada la condición anterior aplicamos ANOVA de un factor a los resultados obtenidos, lo que se muestra en las tablas V.17 (M1), V.18 (M2) y V.19 (M3).

Tabla V.17 Resultados de ANOVA aplicado a los resultados del análisis de la muestra 1.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	10.470	3	3.4900	207.75	3.24
Dentro de los grupos	0.269	16	0.0168		
Total	10.739	19			

Tabla V.18 Resultados de ANOVA aplicado a los resultados del análisis de la muestra 2.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F_{cal}	F_{tab}
---------------------------	----	----	----	-----------	-----------

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Entre grupos	9.422	3	3.1407	24.27	3.24
Dentro de los grupos	2.071	16	0.1294		
Total	11.493	19			

Tabla V.19 Resultados de ANOVA aplicado a los resultados del análisis de la muestra 3.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	10.521	3	3.5071	53.51	3.24
Dentro de los grupos	1.049	16	0.0655		
Total	11.570	19			

Tal y como en el caso del estándar de 0.5 ppm, procedimos a calcular las DERr y la DERR a partir de los datos obtenidos en el ANOVA, los resultados se muestran en la tabla V.20.

Tabla V.20 Resultados de DER de repetibilidad (DER^r) y reproducibilidad (DER^R) de las muestras 1, 2 y 3, calculados a partir del ANOVA.

Muestra	DER^r	DER^R
M1	2.42	8.14
M2	10.56	15.54
M3	5.98	11.38

Como podemos ver en la tabla V.19, la desviación estándar relativa de la reproducibilidad y de la precisión intermedia de las muestras es excelente ya que son menores a los valores establecidos de 20% para la repetibilidad y 30% para la reproducibilidad.

El cálculo de los valores de DER^R y DER^r , utilizando la ecuación de Horwitz, se muestran en la tabla V.21.

Tabla V.21 Resultados de DER de repetibilidad (DER^r) y reproducibilidad (DER^R) de las muestras 1, 2 y 3, calculados a partir de la ecuación de Horwitz.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	DER _H ^r	DER _H ^R
M1	5.80	8.79
M2	6.21	9.41
M3	6.00	9.09

Los valores de la tabla V.21 fueron usados en conjunto con los valores de la tabla V.20, para obtener el parámetro Horrat. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.22.

Tabla V.22 Resultados del cálculo del parámetro de Horrat de las muestras 1, 2 y 3.

Muestra	Horrat ^r	Horrat ^R
M1	0.42	0.93
M2	1.70	1.65
M3	1.00	1.25

Los resultados reflejados en la tabla V.22, demuestran que tanto la repetibilidad como la reproducibilidad o precisión intermedia del método es excelente.

Con el fin de comprobar la aleatoriedad de los resultados obtenidos en la repetibilidad de las muestras, elaboramos un gráfico de control, los que se muestran en las figuras V.7, V.8 y V.9.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

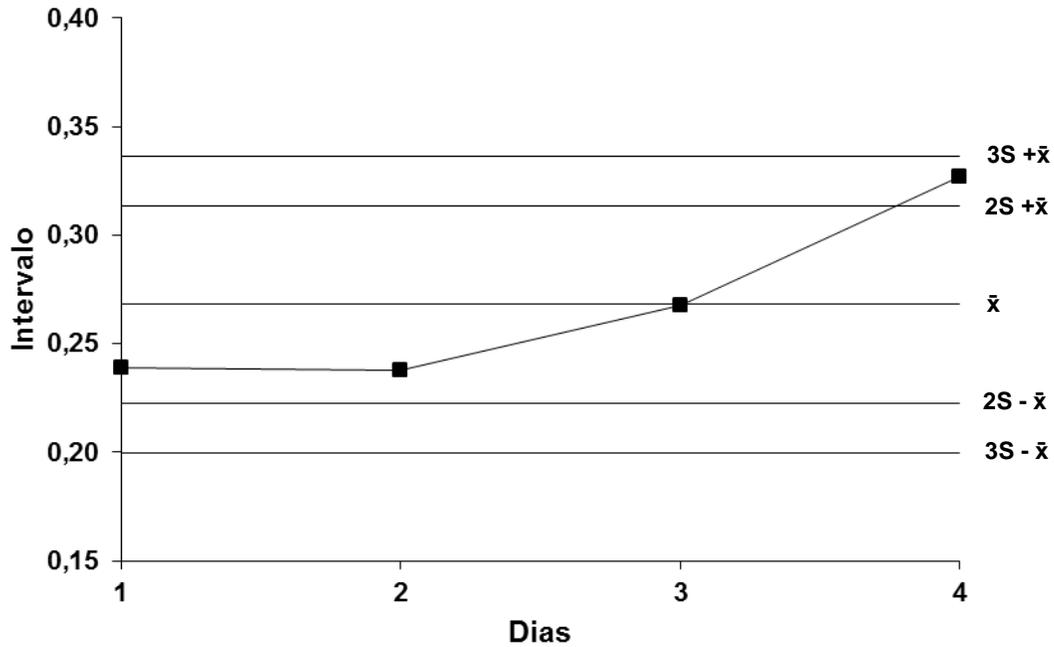


Figura V.7 Grafico de control de la muestra 1 (Frijoles blancos).

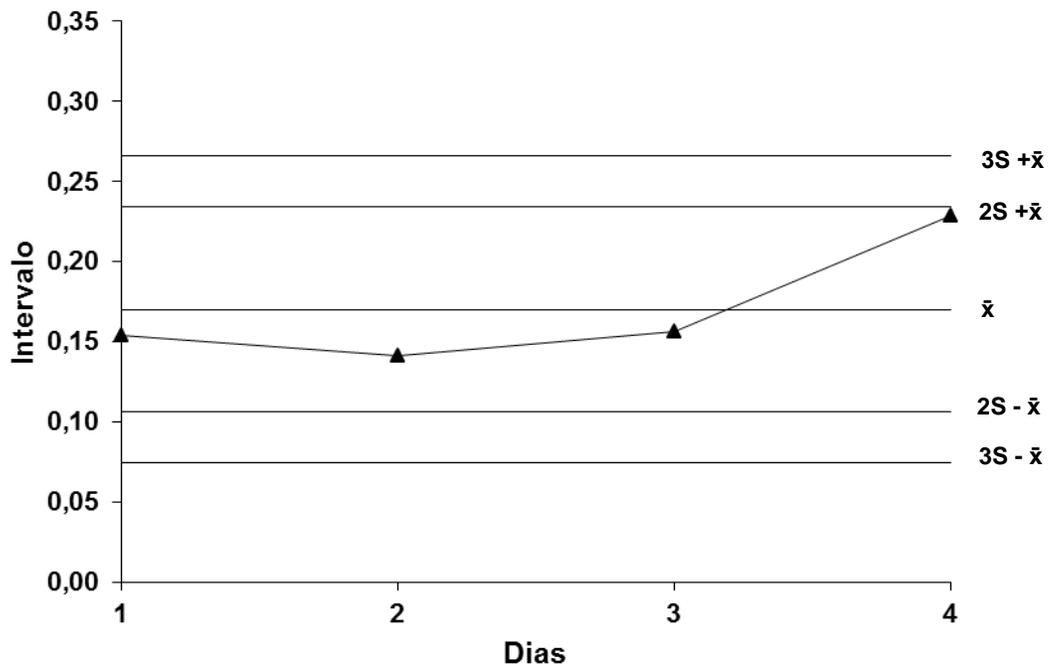


Figura V.8 Grafico de control de la muestra 2 (frijoles negros).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

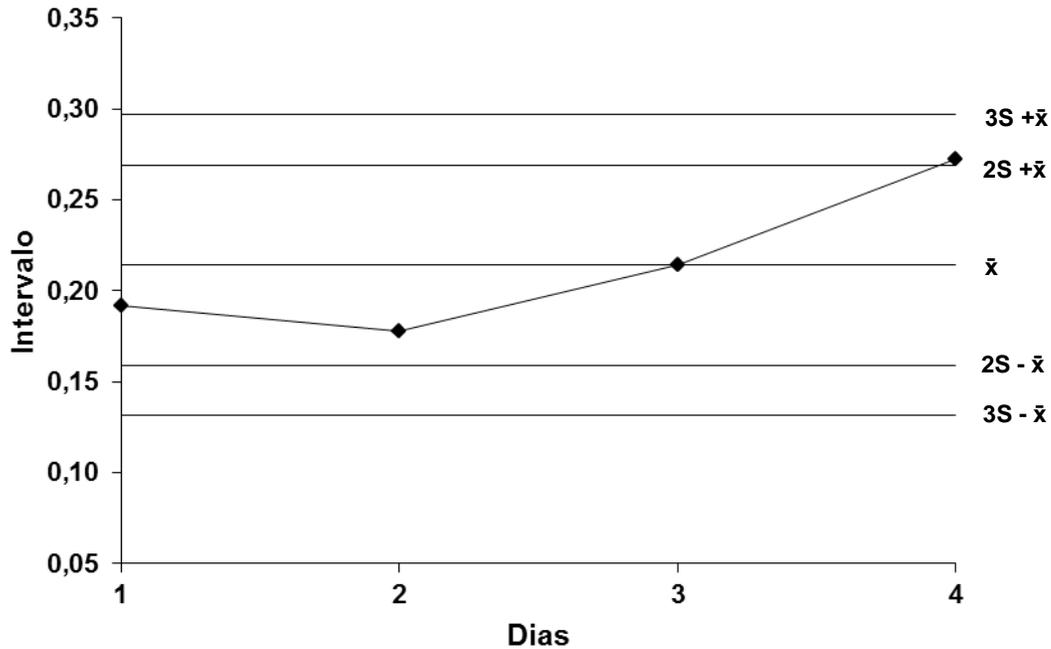


Figura V.9 Grafico de control de la muestra 3 (frijoles rojos).

Tal y como se observa en las figuras V.7 a V.9, todas las muestras, se encuentran bajo control, especialmente en los primeros 3 días del estudio, ya que estaban muy cercanas a la media de los resultados aunque en el cuarto día se observó una tendencia hacia la salida del grafico de control, lo que nos indica que posiblemente después del día 4, los resultados estarían fuera de control.

Finalmente con el fin de verificar que no hay diferencias significativas entre las medias de cada día de estudio, procedimos a graficar los intervalos de confianza de las muestras estudiadas, lo que se refleja en la figura V.10.

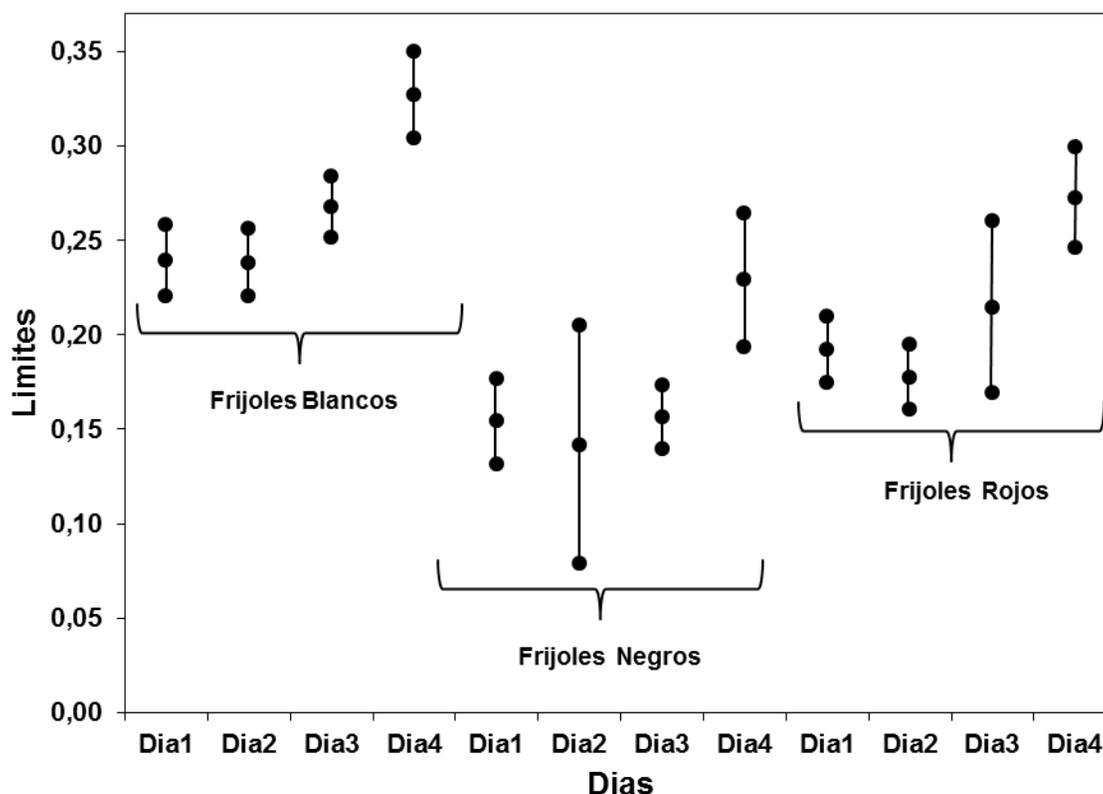


Figura V.10 Grafico de límites de confianza de las muestras.

Tal y como se puede observar en la Figura V.10, en todos los días encontramos puntos comunes, por otra parte se pudo comprobar que la media de los resultados abarca o toca a todos los intervalos, por lo que podemos considerar que los resultados se encuentran bajo control.

V.2.5 EXACTITUD

V.2.5.1 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN CALCULADO A PARTIR DE MUESTRAS FORTIFICADAS

Debido a que no contábamos con un material de referencia certificado de hierro, que nos permitiera estudiar la exactitud instrumental y del método adecuadamente, procedimos a evaluarla mediante la obtención de porcentajes de recuperación o recobro del analito.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para esto fortificamos las muestras molidas con una cantidad de hierro previamente establecida y sometimos a las muestras a todo el proceso de análisis. Paralelamente analizamos en las mismas condiciones muestras sin fortificar. El contenido de hierro fue determinado por diferencia del contenido de hierro en las muestras fortificadas del contenido de hierro en las muestras sin fortificar. El porcentaje de recobro o recuperación fue calculado de la forma siguiente:

$$\%R = \left(\frac{\text{Cantidad de hierro encontrada}}{\text{Cantidad de hierro esperada}} \right) \times 100$$

Un estándar de hierro de concentración 0.5 ppm, fue igualmente analizado para determinar el %R instrumental. Los porcentajes obtenidos se muestran en la tabla V.23, mientras que en la figura V.11, se muestra el grafico de barras de la media de los porcentajes de recobro obtenidos.

Tabla V.23 Porcentajes de recobro obtenido para las muestras y el estándar.

n	%R(M1)	%R(M2)	%R(M3)	%R(0.5ppm)
1	116.5	100.7	109.5	97.6
2	115.1	102.2	108.1	99.9
3	113.6	104.1	106.2	98.5
Media	115.1	102.3	107.9	98.7

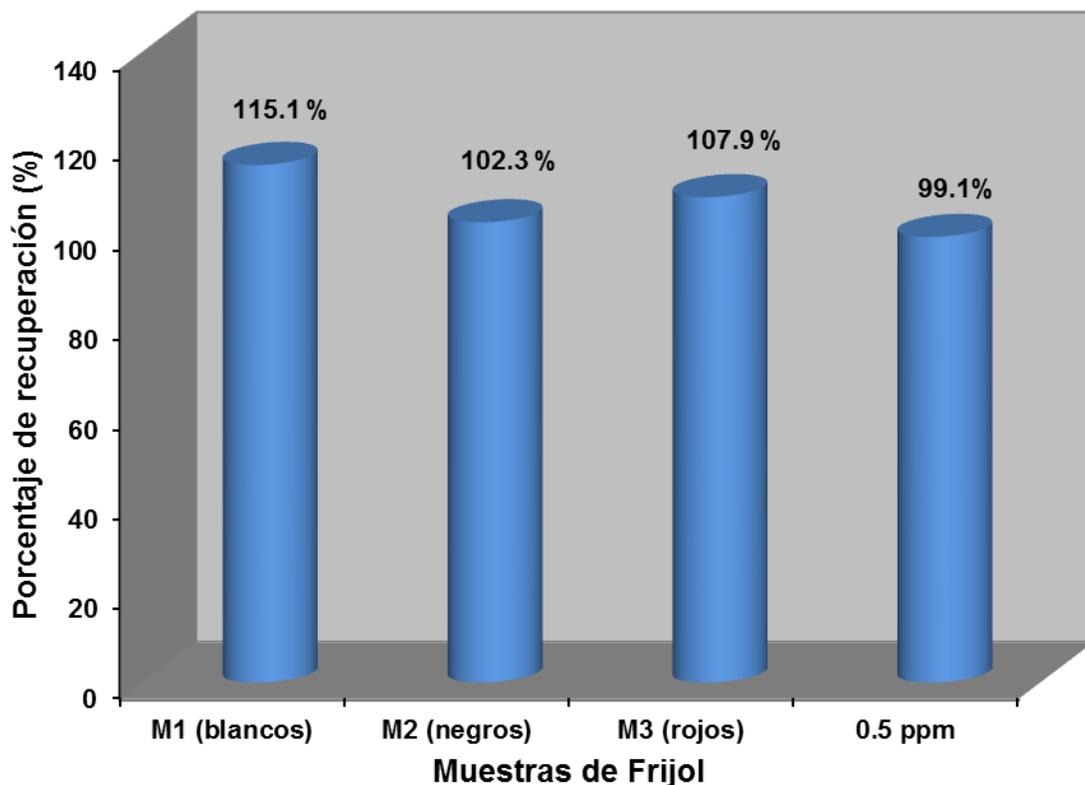


Figura V.11 Gráfico de barras de los porcentajes de recuperación de las muestras y del estándar de 0.5 ppm.

Tal y como se observa tanto en la tabla V.23 y en la figura V.11 los porcentajes de recuperación para las muestras se ubican entre el 102.3 y el 115.1%, mientras que para el estándar fue de 99.1%. En la bibliografía se establece que rangos de concentración entre 100 ppb y 1 ppm, los porcentajes de recuperación deben ser entre 80 y 110%, por lo que únicamente la muestra M1 (frijol blanco) estaría un poco fuera de lo establecido.

Si relacionamos la exactitud con el porcentaje de recobro obtenido podemos decir que la exactitud instrumental es excelente y que la exactitud del método se buena salvo para el caso de la muestra M1, que se distanció un poco del valor esperado.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.5.2 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN CALCULADO A PARTIR DE LAS RECTAS DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN Y CALIBRACIÓN NORMAL.

En este caso evaluamos también la exactitud como porcentaje de recuperación de las muestras, pero utilizando los valores de las pendientes de las rectas de calibración por adición patrón (RCAP) y normal (RCN), mediante la siguiente fórmula:

$$\%R \left(\frac{b_1^{RCAP}}{b_1^{RCN}} \right) \times 100$$

Los parámetros de las rectas las rectas de adición patrón y normal se muestran en la tabla V.24 y los resultados del cálculo de los porcentajes obtenidos se muestran en la tabla V.25.

Tabla V.24 Parámetros de las rectas de calibración de adición patrón y normal.

Parámetro	CCN	RCAPM1	RCAPM2	RCAPM3
b_1	0.1095	0.1043	0.1027	0.1048
b_0	0.0097	0.0710	0.0643	0.0598
R^2	0.9981	0.9998	1.0000	0.9999
$S_{Y/X}$	0.0022	0.0006	0.0003	0.0004

Tabla V.25 Porcentajes de recuperación de las muestras obtenidos a partir de las pendientes de las rectas de adición patrón y normal.

%R(M1)	95.2
%R(M2)	93.8
%R(M3)	95.7

Si relacionamos estos resultados con lo recomendado en la bibliografía podemos decir que todas las muestras se encuentran en el intervalo esperado por lo que el método presenta buena exactitud en sus resultados.

V.2.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACION

Como ya hemos mencionado en el marco teórico, el límite de detección es la mínima concentración que proporciona una señal significativamente diferente a la de un blanco y que puede considerarse que es causada por el analito.

El límite de cuantificación se define como la mínima concentración de analito que origina medidas cuantitativas con aceptable exactitud y precisión y que puede considerarse como el límite inferior del rango lineal.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación utilizamos los datos de las rectas de calibración normal obtenidos durante los 4 días de estudio de repetibilidad. La media de los parámetros de las rectas obtenidos en esos días se muestran en la tabla VI.26.

Tabla V.26 Media de los parámetros de las rectas de regresión normal usados en el cálculo de límites de detección y cuantificación.

Parámetros	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
b_0	0.0049	0.0033	0.0035	0.0035
b_1	0.0881	0.0921	0.0889	0.0923
Sb_0	0.0024	0.0015	0.0011	0.0014
Sb_1	0.0040	0.0025	0.0018	0.0023
$S_{y/x}$	0.0031	0.0020	0.0015	0.0018

Por otra parte los límites de detección y de cuantificación, decidimos calcularlos empleando dos formas.

- 1) Utilizando en el cálculo la pendiente de las rectas y la desviación estándar de los puntos en la dirección del eje y ($S_{y/x}$), empleada en muchos casos para datos obtenidos mediante la técnica de espectrofotometría de UV-Vis y en rangos de concentración relativamente bajos. Las ecuaciones de cálculo empleadas fueron:

ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$LD = \frac{3.29 \times S_{y/x}}{b_1} \quad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

Donde:

$S_{y/x}$ es la desviación estándar de los puntos en la dirección de la variable y

b_1 es la pendiente de la recta

- 2) Utilizando una ecuación que toma en cuenta los efectos tanto sobre el eje x como sobre el eje y, la que proporciona una mayor precisión en la determinación de los límites en rangos de concentración bajos. En este caso las ecuaciones de cálculo empleadas fueron:

$$LD = 3.29 \times S_0 \quad LC = 10 \times S_0$$

Donde S_0 se calcula de la siguiente forma:

$$S_0 = \frac{S_{y/x}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Dónde:

x_i son los datos individuales de concentración usados en la recta

Dado que teníamos datos de 20 rectas de regresión, optamos por trabajar con la media de los resultados de cada día, obteniendo finalmente la media total de los cálculos realizados, así en la tabla VI.27, se reflejan la media final de los resultados de los cálculos de LD y LC para las 2 formas de cálculo.

Tabla V.27 Media de los límites de detección y cuantificación de las 2 formas de cálculo empleadas.

Límite	Forma de cálculo 1	Forma de cálculo2
Detección	0.05	0.06
Cuantificación	0.15	0.19

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como podemos observar en la tabla VI.27, los límites de detección son similares independientemente de la forma de calcularlos, siendo estos cercanos a los 0.055 mg/L.

Por otra parte los límites de cuantificación presentan una mayor diferencia en cuanto a los resultados de las dos formas de cálculo, sin embargo esta no es muy grande, por lo que podemos decir que el límite de cuantificación del método es cercano a los 0.17 mg/L.

V.2.7 INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS

La incertidumbre es un parámetro que está asociado al resultado de una medición analítica, que nos indica cuan dispersos están los datos y las posibles fuentes de error que pueden influir en la determinación de un analito.

La determinación del contenido de hierro en las muestras de frijoles fue realizada a partir del modelo de calibración de la curva de regresión normal, según la siguiente ecuación:

$$Fe\left(\frac{mg}{100g}\right) = \frac{\frac{A_m - b_0}{b_1} \times \frac{V_2}{V_1} \times 10}{M_m}$$

Dónde:

A_m: es la absorbancia de la muestra

b₀: es el intercepto de la recta de regresión normal

b₁: es la pendiente de la recta de regresión normal

V₂: es el volumen final al que se llevó la muestra

V₁: es el volumen inicial o alícuota de la muestra

M_m: es la masa de la muestra

Una vez establecido el modelo matemático utilizado en el cálculo de la concentración de hierro en las muestras de frijoles, procedimos a identificar las posibles fuentes de incertidumbre en el proceso de análisis.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Finalmente calculamos la incertidumbre mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{U_{C_{FE}}}{C_{FE}} = \sqrt{\left(\frac{U_{A_m}}{A_m - b_0}\right)^2 + \left(\frac{U_{b_0}}{A_m - b_0}\right)^2 + \left(\frac{U_{b_1}}{b_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{V_2}}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{U_m}{m}\right)^2}$$

Esta ecuación lleva incluida todas las posibles fuentes de errores, incluyendo el ruido fotométrico, la precisión fotométrica en la incertidumbre de las absorbancias y los errores en la pendiente, intercepto, factores de dilución y pesada de la muestra. En la tabla V.28, se muestran los resultados para el cálculo de la incertidumbre usando la ecuación anterior.

Tabla V.28 Concentración de hierro en mg/100g, de las muestras de frijoles crudos con sus valores de incertidumbre.

Frijoles blancos		Frijoles negros		Frijoles rojos	
6.15	±0.92	7.24	±0.92	5.63	±0.90

Tal y como se observa en la tabla V.28, los valores de incertidumbre son cercanos a 0.90, siendo similares para las muestras de frijoles blancos y negros y un poco menor en el caso de la muestra de frijoles rojos.

V.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

Para la determinación del contenido de hierro en las muestras de frijoles tratadas térmicamente, se tomaron muestras, que fueron cocidas, secados, molidas y analizadas paralelamente con muestras molidas de frijoles sin tratamiento térmico (crudos) tal y como se muestra en el esquema IV.5.1.2. La media de los resultados obtenidos para ambos casos, así como la diferencia entre ellas se muestra en la tabla V.29 y en la figura V.12.

Tabla V.29 Media de los resultados de contenido de hierro en mg/100 g, de las muestras antes y después de su tratamiento térmico y la diferencia entre ellas.

Muestras	Crudos	Cocidos	Diferencia
Frijoles blancos (M1)	6.15	3.11	3.04
Frijoles negros (M2)	7.24	3.54	3.69
Frijoles rojos (M3)	5.63	2.07	3.56

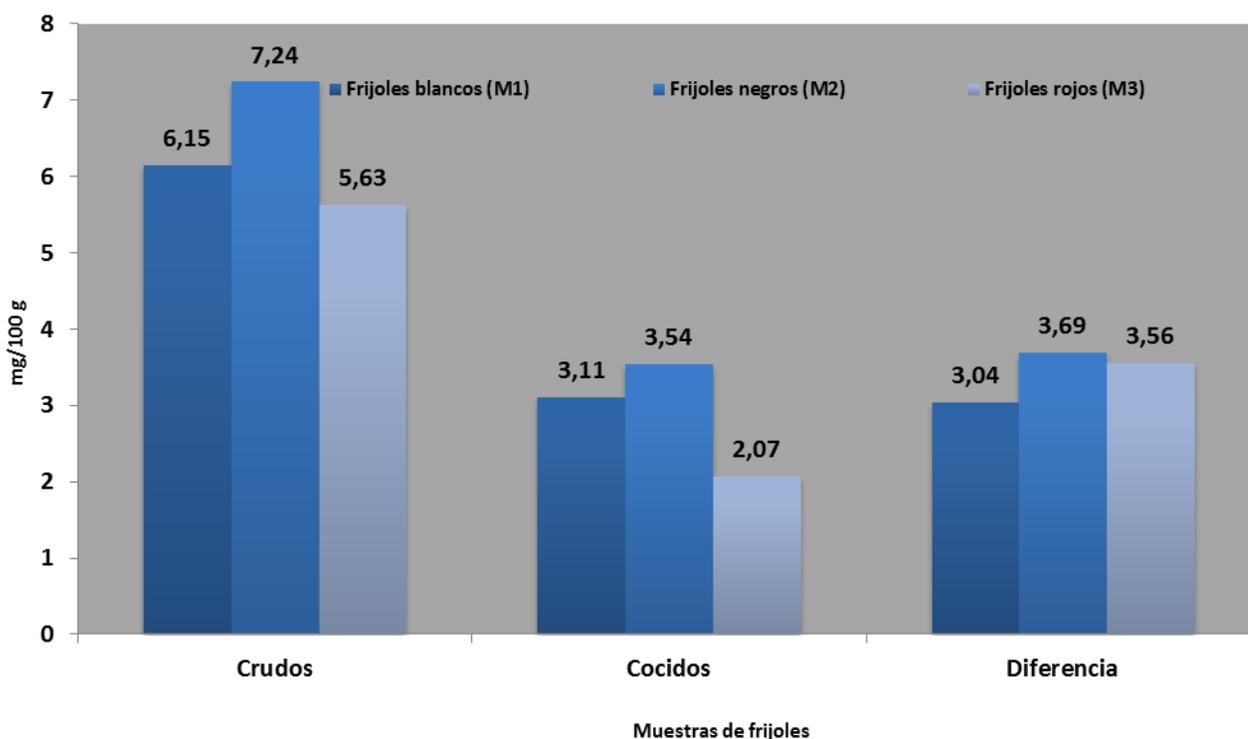


Figura V.12 Gráfico de barras de los porcentajes contenido de hierro de las muestras

Los resultados reflejados en la tabla V.29 y en la figura V.12, claramente establecen diferencias entre las muestras de frijoles, de tal forma que podemos decir que las muestras de frijoles negros son las que contienen mayor contenido de hierro tanto en estado crudo y cocido como en el agua de extracción, mientras que las que muestras de frijoles rojos contienen la menor cantidad, y las muestras de frijoles blancos contienen cantidades intermedias entre estas las anteriores.

V.3.1 COMPARACIÓN PORCENTUAL DE LAS MUESTRAS

La resultados observados en la tabla V.29 y en la figura V.12, nos llevó a tratar de establecer diferencias entre las distintas muestras de frijoles en cuanto a su contenido de hierro. Así decidimos compararlas considerando las siguientes relaciones:

- Frijol Negro vs. Frijol Blanco
- Frijol Negro vs. Frijol Rojo
- Frijol Blanco vs. Frijol Rojo

Esta relación la realizamos comparando los porcentajes de diferencia en el contenido de hierro relación del primer elemento de cada relación en relación al segundo.

Así podemos decir que los frijoles blancos crudos tienen un 15.05% menos de hierro que los frijoles negros crudos y que los frijoles rojos crudos tienen un 22.4% menos de hierro que los frijoles negros crudos y a su vez los frijoles rojos crudos tienen un 8.47% de hierro menos que los frijoles blancos crudos. En todos los casos los frijoles rojos crudos tienen menos contenido de hierro que las otras muestras de frijoles.

En lo que se refiere al a los frijoles cocidos, podemos decir que los frijoles blancos cocidos tienen un 12.37% menos de hierro que los frijoles negros cocidos y que los frijoles rojos cocidos tienen un 41.53% menos de hierro que los frijoles negros cocidos y a su vez los frijoles rojos cocidos tienen un 33.27% de hierro menos que los frijoles blancos cocidos. A igual que en el caso de los frijoles rojos crudos, los

ANÁLISIS DE RESULTADOS

frijoles rojos cocidos tienen menor contenido de hierro que las otras muestras de frijoles, pero en este caso es mucho mayor lo que nos indica que posiblemente a que la extracción del hierro por el agua de cocción sea mayor en los frijoles rojos.

Debido a lo observado anteriormente, decidimos relacionar los contenidos de hierro antes y después de su cocción. Creemos que la diferencia entre estos es debida a que el hierro es extraído hacia el agua de cocción, quedando el remanente en los frijoles cocidos. Esto sustenta la creencia popular de que en el agua de cocción de los frijoles, llamada en muchos casos “sopa” existe un alto contenido de hierro, el que depende del tipo de frijoles a ser cocido.

En este sentido podemos decir que el agua de cocción de los frijoles blancos tienen un 17.61% menos de hierro que el agua de cocción de los frijoles negros y que el agua de cocción de los frijoles rojos tiene un 3.73% menos de hierro que el agua de cocción de los frijoles negros, pero el agua de cocción de los frijoles rojos tienen un 16.85% de hierro **más** que el agua de cocción de los frijoles blancos. Cabe destacar que la diferencia respecto a los frijoles negros es menor que en el caso de las muestras crudas y cocidas, y que inclusive su contenido es mayor respecto al agua de cocción de los frijoles blancos, situación que no ocurre en las muestras crudas y cocidas.

Esto es llamativo ya que nos indica, que a pesar de que el contenido de hierro de los frijoles rojos tanto en su estado crudo como cocido es menor, en relación a las otras muestras, mayor es su capacidad de transferir hierro hacia el agua de cocción y por lo tanto se compensa las diferencias ya observadas.

V.3.2 COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS MUESTRAS

Dado que la comparación porcentual nos indicaba diferencias entre las muestras de frijoles consideramos oportuno confirmar estadísticamente nuestras primeras apreciaciones.

Debido a que sólo teníamos una variable de comparación, decidimos utilizarla para comparar las muestras de frijoles, para esto empleamos inicialmente una prueba de comparación de varianzas, usando el test de Bartlett. Las hipótesis planteadas fueron:

ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$H_0: S_{\text{Frijoles negros}}^2 = S_{\text{Frijoles blancos}}^2 = S_{\text{Frijoles rojos}}^2$$

$$H_1: S_{\text{Frijoles negros}}^2 \neq S_{\text{Frijoles blancos}}^2 \neq S_{\text{Frijoles rojos}}^2$$

Establecimos que se acepta H_0 si $X^2_0 < X^2_{(0.05, n-1)}$, y por lo tanto las varianzas de las muestras de frijoles son iguales. En la tabla V.30, se muestra el resultado de la aplicación del test de Bartlet.

Tabla V.30 Resultados del test de Bartlet de los resultados de la comparación de las varianzas de las muestras de frijoles.

Parámetro	Crudos	Cocidos	Extraídos
C	2.17	2.17	2.17
S^2_{conj}	0.00	0.01	0.02
X^2_0	57.87	0.40	0.32
$X^2_{(0.05, 2)}$	5.99	5.99	5.99

Tal y como se observa en la tabla V.30, las varianzas de los contenidos de hierro en las muestras crudas es diferente ya que $X^2_0 > X^2_{(0.05, 2)}$, mientras que en el caso de los frijoles cocidos o en los extraídos las varianzas son iguales ya que $X^2_0 < X^2_{(0.05, 2)}$.

V.3.2.1 COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE FRIJOLES CRUDOS

Dado los resultados obtenidos para las muestras crudas de frijoles decidimos realizar una comparación de medias múltiples, aplicando una comparación de medias simultáneas, esto porque no podíamos aplicar ANOVA, las parejas de comparación a ser consideradas fueron:

$$\bar{x}_{\text{Frijoles negros}} \text{ vs. } \bar{x}_{\text{Frijoles blancos}}$$

$$\bar{x}_{\text{Frijoles negros}} \text{ vs. } \bar{x}_{\text{Frijoles rojos}}$$

$$\bar{x}_{\text{Frijoles blancos}} \text{ vs. } \bar{x}_{\text{Frijoles rojos}}$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para esto inicialmente realizamos una comparación de varianzas mediante el test de Fisher, en este caso las hipótesis planteadas fueron:

Para el primer par de comparación:

$$H_0: S_{\text{Frijoles negros}}^2 = S_{\text{Frijoles blancos}}^2$$

$$H_1: S_{\text{Frijoles negros}}^2 \neq S_{\text{Frijoles blancos}}^2$$

Para el segundo par de comparación fueron:

$$H_0: S_{\text{Frijoles negros}}^2 = S_{\text{Frijoles rojos}}^2$$

$$H_1: S_{\text{Frijoles negros}}^2 \neq S_{\text{Frijoles rojos}}^2$$

Para el tercer par de comparación fueron:

$$H_0: S_{\text{Frijoles blancos}}^2 = S_{\text{Frijoles rojos}}^2$$

$$H_1: S_{\text{Frijoles blancos}}^2 \neq S_{\text{Frijoles rojos}}^2$$

Estableciendo que se acepta H_0 si $F_{\text{cal}} < F_{(0.05, n-1)}$, y por lo tanto las varianzas de las muestras de frijoles crudos son iguales, en caso contrario son diferentes. Esto lo realizamos con el fin de establecer qué tipo de comparación de medias debíamos aplicar. En la tabla V.31, se muestra el resultado de la aplicación del test de Fisher aplicado a las muestras crudas.

Tabla V.31 Resultados del test de Fisher de comparación de las varianzas de las muestras de frijoles crudos.

Par de comparación	F_{cal}	$F_{(0.05, 2)}$
Frijol Negro vs. Frijol Blanco	1.00	19
Frijol Negro vs. Frijol Rojo	5.68E+27	19
Frijol Blanco vs. Frijol Rojo	5.68E+27	19

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la tabla V.31, las varianzas del par de comparación Frijol Negro vs. Frijol Blanco son iguales ya que $F_{cal} < F_{(0.05,2)}$, mientras que los restantes pares presentan diferentes varianzas, ya que $F_{cal} > F_{(0.05,2)}$.

Una vez establecida la similitud y/o diferencia entre las varianzas de los pares de relación de las muestras crudas, decidimos realizar una comparación de medias apareadas, dado que teníamos igual cantidad de datos para las diferentes muestras, en este caso planteamos las hipótesis siguientes:

Para el primer par de comparación fueron:

$$H_0: \bar{x}_{\text{Frijoles negros}} = \bar{x}_{\text{Frijoles blancos}}$$

$$H_1: \bar{x}_{\text{Frijoles negros}} \neq \bar{x}_{\text{Frijoles blancos}}$$

Para el segundo par de comparación fueron:

$$H_0: \bar{x}_{\text{Frijoles negros}} = \bar{x}_{\text{Frijoles rojos}}$$

$$H_1: \bar{x}_{\text{Frijoles negros}} \neq \bar{x}_{\text{Frijoles rojos}}$$

Para el tercer par de comparación fueron:

$$H_0: \bar{x}_{\text{Frijoles blancos}} = \bar{x}_{\text{Frijoles rojos}}$$

$$H_1: \bar{x}_{\text{Frijoles blancos}} \neq \bar{x}_{\text{Frijoles rojos}}$$

Estableciendo que H_0 se aceptaba si $t_{cal} < t_{(0.05, n-1)}$, y por lo tanto las medias del par de comparación eran iguales y existía relación de los pares en cuanto a su contenido de hierro. Los resultados de la comparación de medias se muestran en la tabla V.32.

Tabla V.32 Resultados del test de comparación de medias de los pares de muestras de frijoles crudos

Parámetro	Frijol negro vs blanco	Frijol negro vs rojo	Frijol blanco vs rojo
t_{cal}	23	34	11

ANÁLISIS DE RESULTADOS

t_{tab}	4.30	4.30	4.30
-----------	------	------	------

Tal y como se observa en la tabla V.32, los valores de t_{cal} en todos los casos de comparación de pares de muestras de frijoles son mayores que los valores de $t_{(0.05, n-1)}$, por lo que establecemos que las medias son diferentes y no existe relación entre los pares de muestras de frijoles crudos en cuanto a su contenido de hierro.

V.3.2.2 COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE FRIJOLES COCIDOS Y AGUA DE EXTRACCIÓN

Los resultados reflejados en la tabla V.30, nos indicaban que las varianzas de las muestras de frijoles cocidos y del agua de extracción eran iguales, por lo que si podíamos aplicar ANOVA a estas muestras en este caso las hipótesis planteadas fueron:

$$H_0: \bar{x}_{Frijoles\ negros} = \bar{x}_{Frijoles\ blancos} = \bar{x}_{Frijoles\ rojos}$$

$$H_1: \bar{x}_{Frijoles\ negros} \neq \bar{x}_{Frijoles\ blancos} = \bar{x}_{Frijoles\ rojos}$$

Si $F_{cal} < F_{(0.05; n-1-n-2)}$, se acepta la H_0 y se rechaza la H_1 por lo que las medias de las muestras son iguales, en caso contrario se rechazan y no son iguales. Los resultados de ANOVA aplicado tanto a las muestras cocidas como, al agua de extracción se muestran en las tablas V.33 y V.34.

Tabla V.33 Resultados de ANOVA aplicado a las muestras de frijoles cocidos.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	3.43	2	1.71	153.47	5.14
Dentro de los grupos	0.07	6	0.01		
Total	3.49	8			

Tabla V.34 Resultados de ANOVA aplicado a las muestras del agua de extracción.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	0.70	2	0.35	22.51	5.14
Dentro de los grupos	0.09	6	0.02		

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Total	0.80	8
-------	------	---

Tal y como se observa en las tablas V.33 y V.34, los valores de F_{cal} son mayores que los valores de F_{tab} , por lo que establecemos que las medias de los contenidos de hierro en las muestras de frijoles cocidos y en el agua de extracción de éstos es diferente y no hay relación entre las distintas muestras de frijoles.

V.4 RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DEL HIERRO ENCONTRADO EN LAS MUESTRAS CON LAS DOSIS DIARIA RECOMENDADA (DDR).

La Dosis Diaria Recomendada (DDR) conocida también como Ingesta Diaria Recomendada (IDR) es la cantidad o dosis mínima que un humano debe consumir de un determinado nutriente para mantenerse sano.

La DDR de hierro (ver III.2.17), varía según los segmentos de edad y de sexo. Cabe mencionar que es igual en los segmentos de edad 0 a 18 años y para mayores de 50 años, independiente del sexo. Entre los 19 y 50 años la DDR es mayor para las mujeres especialmente para las embarazadas y las que se encuentran en estado de lactancia.

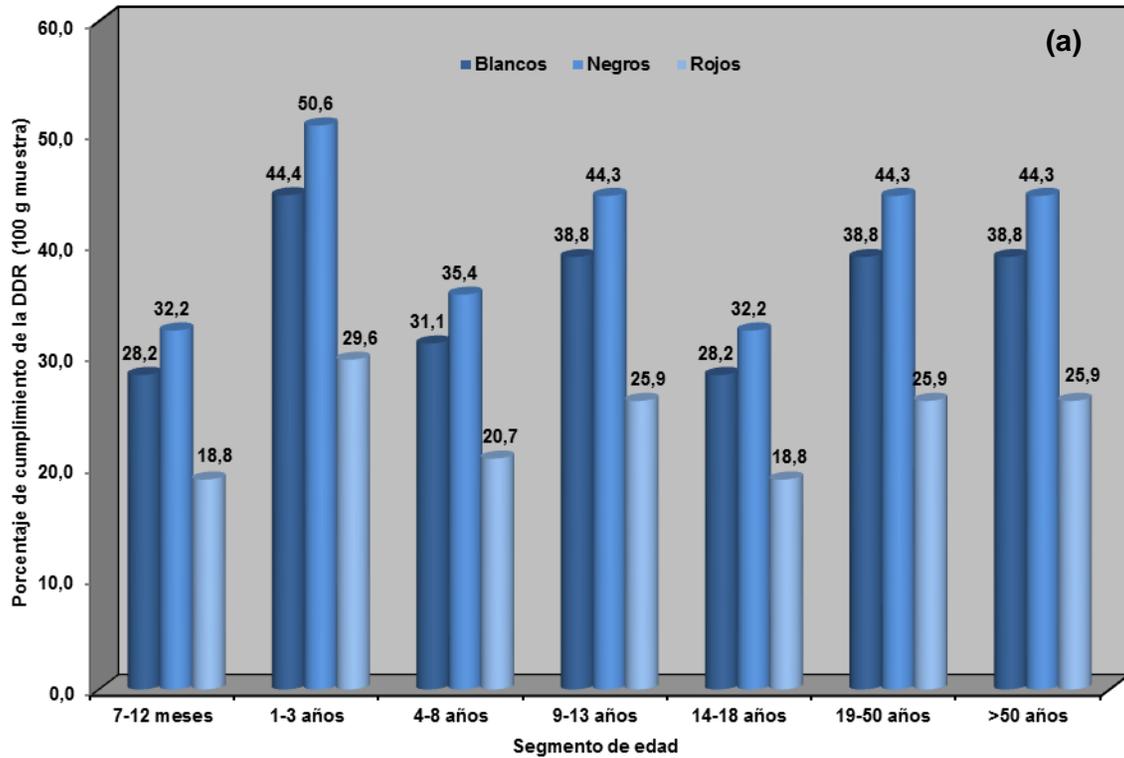
Debido a las diferencias que existen en las DDR de hierro, y ante la falta de estudios similares en la UNAN-León, que involucraran ésta con el contenido de hierro en muestras de frijoles cocidos y su agua de extracción, decidimos tomar como referencia los resultados reflejados en la tabla V.29 y los relacionamos porcentualmente con el cumplimiento de la DDR, esto para tener un parámetro de referencia que nos diera una idea de sobre la relación de nuestros resultados con la DDR y su posible uso con fines nutricionales.

Para esto establecimos una relación porcentual del cumplimiento de la DDR únicamente con las muestras de frijol cocido y de agua de extracción, ya que las muestras de frijol crudo no son consumidas por la población.

Por otra parte debido a que los datos de la tabla V.29, reflejaban el contenido de hierro en mg por cada 100 g de muestra, decidimos tomar como punto de referencia

ANÁLISIS DE RESULTADOS

raciones de 100 gramos de las muestras de frijoles para relacionarlas con el porcentaje de cumplimiento de la DDR. Los resultados se muestran en las figuras V.13 para los hombres y V.14 para las mujeres y en las tablas V.35 y V.36, se muestran los porcentajes de cumplimiento total de la DDR de los frijoles cocidos y del agua de extracción, para hombres y mujeres respectivamente.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

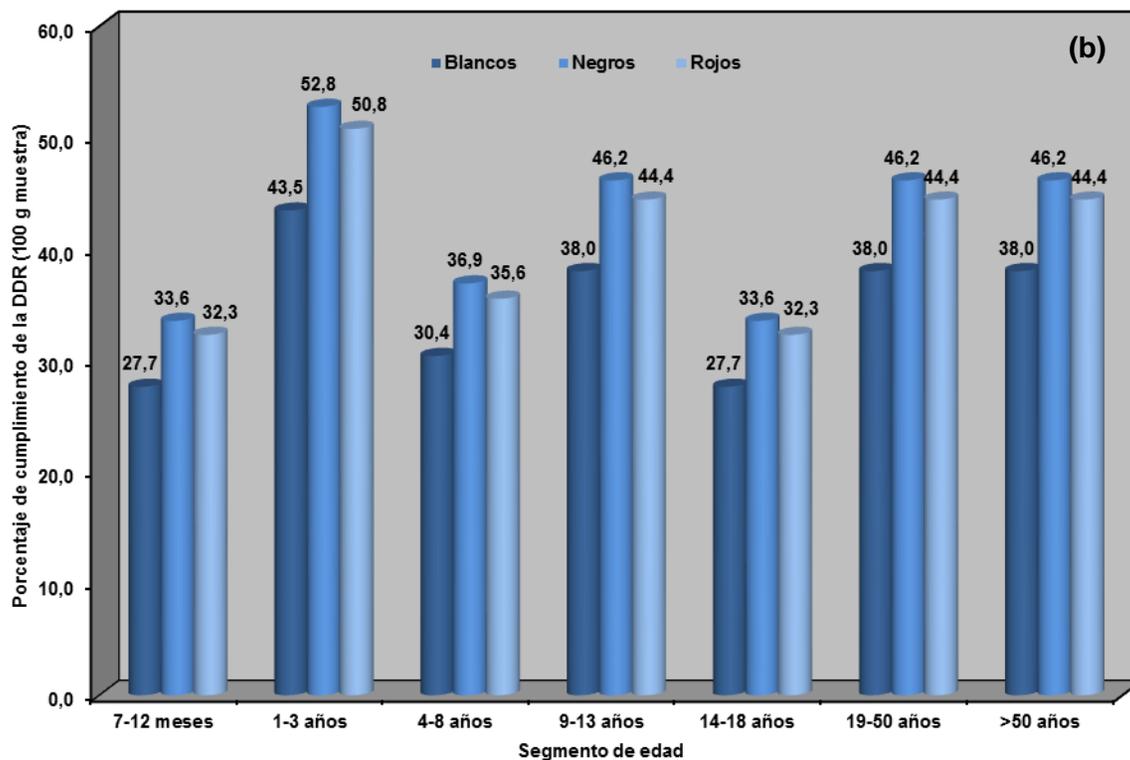
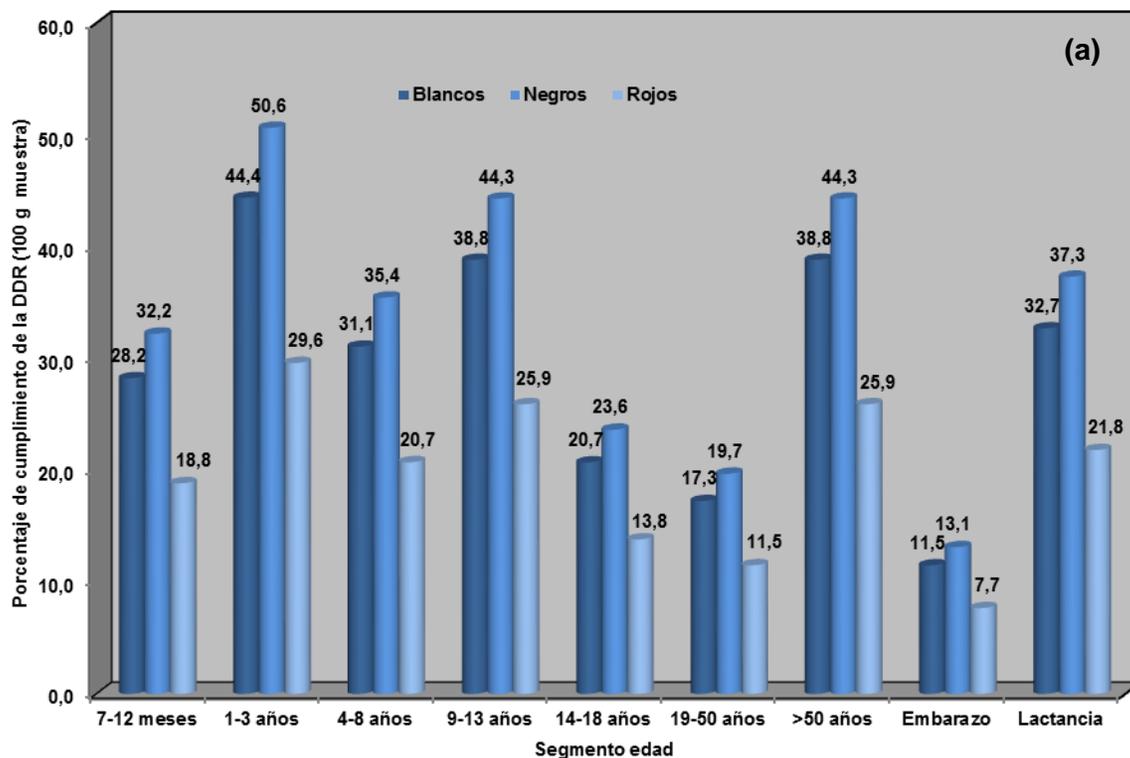


Figura V.13 Gráfico de barras del porcentaje de cumplimiento de la DDR de hierro en hombres de muestras de frijoles (a) cocidos y (b) agua de extracción.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

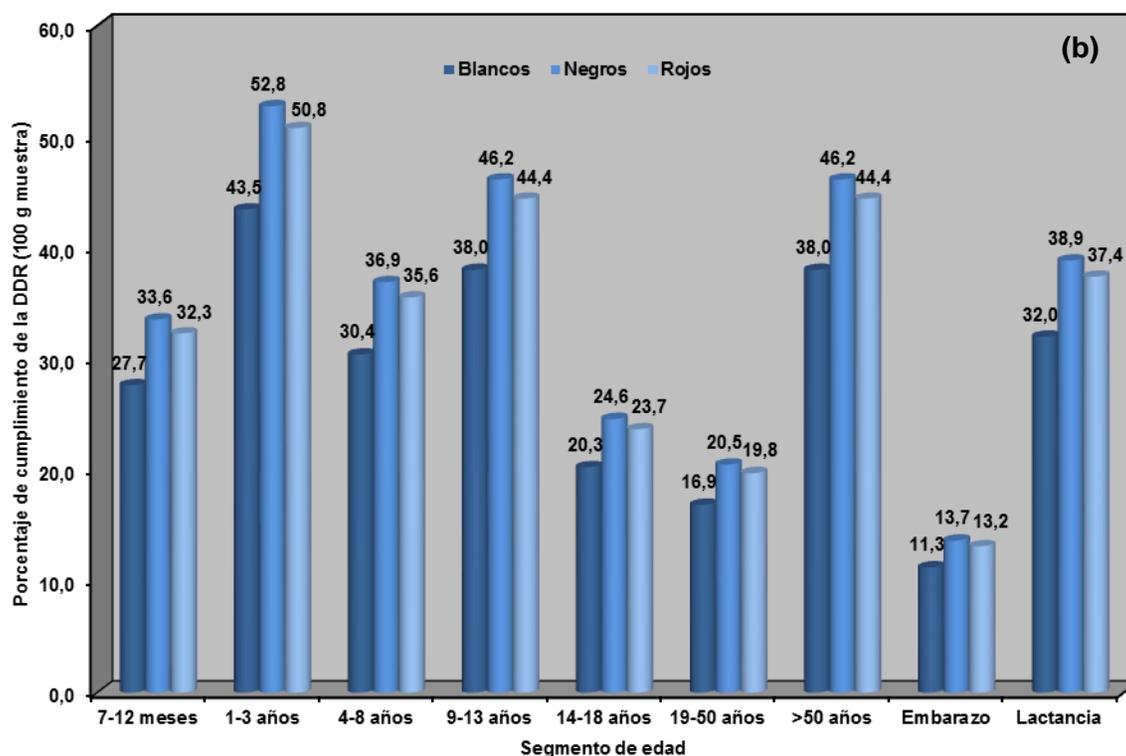


Figura V.14 Gráfico de barras del porcentaje de cumplimiento de la DDR de hierro en mujeres de muestras de frijoles (a) cocidos y (b) agua de extracción.

Tabla V.35 Porcentajes de cumplimiento total de la DDR de hombres de los frijoles cocidos y del agua de extracción de las 3 muestras estudiadas.

Segmento edad	Frijol Blanco	Frijol Negro	Frijol Rojo
7-12 meses	55.9	65.8	51.2
1-3 años	87.8	103.4	80.4
4-8 años	61.5	72.4	56.3
9-13 años	76.9	90.5	70.3
14-18 años	55.9	65.8	51.2
19-50 años	76.9	90.5	70.3
>50 años	76.9	90.5	70.3

Tabla V.36 Porcentajes de cumplimiento total de la DDR de mujeres de los frijoles cocidos y del agua de extracción de las 3 muestras estudiadas.

Segmento edad	Frijol Blanco	Frijol Negro	Frijol Rojo
---------------	---------------	--------------	-------------

ANÁLISIS DE RESULTADOS

7-12 meses	55.9	65.8	51.2
1-3 años	87.8	103.4	80.4
4-8 años	61.5	72.4	56.3
9-13 años	76.9	90.5	70.3
14-18 años	41.0	48.2	37.5
19-50 años	34.2	40.2	31.3
>50 años	76.9	90.5	70.3
Embarazo	22.8	26.8	20.8
Lactancia	64.7	76.2	59.2

En la figura V.13 (hombres), puede observarse que tanto en el caso de los frijoles cocidos como en el caso del agua de extracción, los frijoles negros presentan un mayor cumplimiento porcentual de la DDR. Los frijoles blancos presentan mayor cumplimiento de la DDR que los frijoles rojos en el caso de los frijoles cocidos, sin embargo en el caso del agua de extracción los frijoles rojos presentan mayor cumplimiento que los frijoles blancos.

En la figura V.15 (mujeres), puede observarse una situación similar que lo observado en la figura V.14, ya que en el caso de los frijoles cocidos como en el caso del agua de extracción, los frijoles negros presentan un mayor cumplimiento porcentual de la DDR y los frijoles blancos presentan mayor cumplimiento de la DDR que los frijoles rojos y en el caso del agua de extracción los frijoles rojos presentan mayor cumplimiento que los frijoles blancos.

En las tablas V.35 y V.36, se observa que dado que en los segmentos de edad de 0 a 18 años, tienen iguales umbrales de DDR tanto para los sexos masculinos como femeninos, los porcentajes de cumplimiento son iguales en estos segmentos. Sin embargo se puede observar que los porcentajes de cumplimiento en general son mayores en el caso de las DDR del sexo masculino que en el caso del sexo femenino. Al igual que en el caso de las muestras de frijoles cocidos y de agua de

ANÁLISIS DE RESULTADOS

extracción los frijoles negros presentan un mayor cumplimiento de la DDR, seguido de los frijoles blancos y de los rojos.

Cabe destacar que los cumplimientos son aun menores en el caso de las mujeres embarazadas, ya que la DDR es mayor que en el caso de los otros segmentos de edad, debido a sus requerimientos nutricionales. Aunque el orden de cumplimiento porcentual sigue siendo frijoles negros > blancos > rojos.

VI. CONCLUSIONES

Una vez realizado los análisis de los resultados de la presente monografía, creemos oportuno plantear las siguientes conclusiones:

1. Se logró seleccionar un conjunto de tres muestras de frijoles (blanco, rojo y negro), las que fueron seleccionadas en base a criterios empíricos.
2. Se consiguieron determinar los parámetros experimentales del método. El rango lineal fue de 0 a 1.0 ppm, la linealidad fue determinada de 6 formas comprobándose en todos los casos la linealidad del modelo, las cuales son: prueba de correlación, falta de ajuste, porcentaje de linealidad, análisis de varianza, coeficiente de determinación, gráficos de residuales, también usamos el grafico de control de calidad de la recta de calibración. La Repetibilidad y reproducibilidad se evaluó de dos formas encontrando una desviación estándar relativa de Repetibilidad de 2.69% y una desviación estándar relativa de reproducibilidad de 2.86%, estos valores fueron comprobados con el parámetro de Horrat siendo en los dos casos menor que 2 lo que nos indica una buena repetibilidad y reproducibilidad. El efecto matriz también se evaluó de dos formas en los que se comprobó la ausencia de efecto matriz. Se determinó la exactitud a partir del porcentaje de recuperación de las muestras siendo el porcentaje de recuperación desde 98.7% para un estándar de 0.5 ppm hasta 115.1% de la muestra de frijoles blancos. El límites de detección y cuantificación también fueron determinados de dos formas siendo este límite de detección 0.05 mg/L, y límite de cuantificación 0.15 mg/L... Se determinó la incertidumbre de los resultados siendo esta cercana a +/- 0.90 mg/100g.
3. Se determinó el contenido de hierro en frijoles crudos, frijoles cocidos y en el agua de cocción, siendo estos de 6.15 mg/100g de frijoles blancos 7.24 mg/100g en frijoles negros y 5.63 mg/100g frijoles rojos para los frijoles crudos y 3.11 mg/100g frijoles blancos, 3.54 mg/100g frijoles negros y 2.07 frijoles rojos para frijoles cocidos y en el agua de cocción 3.04 mg/100ml en frijoles blancos, 3.69 mg/100ml frijoles negros y 3.56 mg/100ml frijoles rojos. Se comparó estadísticamente estos

CONCLUSIONES

resultados encontrándose que las tres muestras eran diferentes en cuanto a su contenido de hierro.

4. Se relacionó el contenido de hierro encontrado en las muestras con las dosis diaria recomendada, determinando que los frijoles negros tienen un mayor cumplimiento de dosis diaria recomendada que las otras muestras, tanto en hombres como mujeres lo que constituyen un buen aporte a la dosis diaria recomendada.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. http://es.wikipedia.org/wiki/Phaseolus_vulgaris
2. Revista Saludable <http://www.esmas.com/salud/home/recomendamos/750687.html>
3. <http://es.wikipedia.org/wiki/Hierro>
4. <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm>
5. Revista: El hierro en la nutrición. <http://www.zonadiet.com/nutricion/hierro.htm>
6. Artículos de Revisión http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol16_3_00/hih01300.htm
7. <http://www.vivirnatural.com/alim/hierro.htm>
8. Trabajo realizado por: Shirley Arosa Rebeca Hernando
http://www.xtec.es/~gjimene2/llicencia/students/bscw.gmd.de_bscw_bscw.cgi_d32835875-1___FE_inicio.html
9. Treball realitzat per: Marina Bottino, M^a José González, Lali Mateu, Lourdes Ortiz, Mòdul B - CFGS Química Ambiental, IES MERCÈ RODOREDA - 2002/03 (Espectrofotometría UV-Vis)
10. http://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible
11. Monografía: “Validación y evaluación de la incertidumbre en la determinación de Na, K, Ca, y Mg por espectrofotometría de emisión y absorción atómica en muestras geotérmicas y aplicación de geotermómetros para estimar la temperatura del reservorio”. Autor: Lic. Jorge Isaac Cisne Altamirano. Pág. N°: 35 – 39.
12. SILPA <http://amienses.blogspot.com/2010/04/parametros-de-validacion-de-metodos.html>
13. Guillermo Ramis Ramos, María Celia García Álvarez-Coque. Quimiometría. Carlos Seoane Prado, Editorial Síntesis, S.A. (Madrid España), Año 2001 Pág 61-68. Junio 15, 2011
14. James N. Miller, Janes C. Miller. Estadística y Quimiometria para Química Analítica, 4ta edición, Pearson Educación, S.A. , Madrid 2002.
15. Monografía. Validación de Método para la Determinación de Nitratos utilizando una columna de reducción con cadmio. Autor: Lic. Ela Yariela Downer Arispe.
16. Tesis: Desarrollo y Validación de un método Espectrofotométrico para la Determinación de Ambroxol Clorhidrato en un producto Farmacéutico...Autor: Lic. Johanna del Carmen Vásquez Díaz.

