

**Verificación del análisis de K, Fe, Zn, Mg y Mn
por medio de espectrofotometría de absorción
atómica, bajo requisitos de la norma ISO
17025:2017**

Stefany Nathaly Vivas Loor

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Verificación de análisis de K, Fe, Zn, Mg y Mn
por medio de espectrofotometría de absorción
atómica, bajo requisitos de la norma ISO
17025:2017**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Stefany Nathaly Vivas Loor

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Verificación de análisis de K, Fe, Zn, Mg y Mn por medio de espectrofotometría de absorción atómica, bajo requisitos de la norma ISO 17025:2017

Stefany Nathaly Vivas Loor

Resumen. La determinación de minerales en alimentos es importante para controlar su ingesta diaria por parte de los consumidores. El objetivo principal del estudio fue verificar un método de determinación de minerales (K, Fe, Mn, Zn y Mg) mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) bajo requisitos de la Norma ISO 17025:2017. Con este fin se siguieron las directrices del método oficial AOAC 985.35 para fórmulas infantiles, productos enteros y alimentos para mascotas. Se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones obtenidas y las reportadas en el certificado del material de referencia extendido por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés). Se utilizó un diseño de parcelas divididas, donde la parcela principal fueron los tres analistas que participaron en el proceso de verificación (A1, A2 y A3), las sub-parcelas fueron las dos repeticiones realizadas por cada uno de ellos (R1 y R2) y las sub-sub-parcelas fueron las seis réplicas realizadas en cada repetición. Se comprobó que los criterios de desempeño evaluados (precisión, recuperación, repetibilidad, reproducibilidad, veracidad, exactitud e incertidumbre) estaban dentro del límite aceptable y las medias obtenidas dentro del rango según el certificado del material de referencia. Al resultar todo el análisis positivo se pudo verificar que el método es válido y se puede implementar en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano.

Palabras clave: Exactitud, incertidumbre, material de referencia, minerales, precisión.

Abstract. The determination of minerals in food is important to control their daily intake by consumers. The main objective of the study was to verify a method for determining minerals (K, Fe, Mn, Zn and Mg) by means of atomic absorption spectrophotometry (EAA) under the requirements of the norm ISO 17025: 2017. To this end, the guidelines of the official method AOAC 985.35 for infant formulas, enteral products, and pet foods were followed. An analysis of variance was performed to determine if there were statistically significant differences between the concentrations obtained and those reported in the certificate of the reference material issued by the National Institute of Standards and Technology (NIST). A Split Plot design was used, where the main plot were the three analysts who participated in the verification process (A1, A2 and A3), the sub-plots were the two repetitions carried out by each of them (R1 and R2) and the sub-sub-plots were the six replications made in each repetition. The evaluated performance criteria (precision, recovery, repeatability, reproducibility, veracity, accuracy and uncertainty) were found to be within the acceptable limit and the averages obtained within the range according to the reference material certificate. As all the analyzes were positive, it was possible to verify that the method is valid and can be implemented in the Zamorano Food Analysis Laboratory.

Key words: Accuracy, minerals, precision, reference material, uncertainty.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice General	iii
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA	15
7. ANEXOS	18

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Esquema experimental para el análisis de los minerales Fe, K, Mn, Zn y Mg.	4
2. Criterios de aceptación para minerales por el método oficial AOAC 985.35.	5
3. Rango lineal de concentraciones del EEA.	7
4. Valores de fracción de masa certificados para cada elemento (NIST, 2020).	8
5. Medias obtenidas para los distintos minerales por analista.	9
6. Valores de repetibilidad obtenidos por cada analista.	9
7. Valores de precisión para cada uno de los minerales.	10
8. Valores de recuperación (%) para cada uno de los minerales.	10
9. Valores de incertidumbre (%) para cada uno de los minerales.	11
10. Probabilidades del ANDEVA para la recuperación de minerales.	11

Anexos	Página
1. Parámetros de longitud de onda y flama para determinación de minerales.	18
2. Plan de verificación de minerales.	19

1. INTRODUCCIÓN

El Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), ubicado en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Valle del Yegüare, km 30 carretera a Danlí, Honduras, es un laboratorio acreditado con la Norma ISO 17025:2017. Esta norma es aplicable a todas las organizaciones que realizan ensayos y/o calibraciones para empresas de todos los sectores. Además, abarca distintas áreas de calibración en una gran diversidad de magnitudes y equipos, desde las más clásicas o frecuentes (instrumentos de pesaje, medidores eléctricos) hasta las más específicas (analizadores de gases o fibra óptica), y que prestan sus servicios a todo tipo de industrias (Garza 2017).

Como parte del Sistema de Gestión de Calidad implementado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ) basado en la norma ISO 17025:2017, se busca verificar el método oficial AOAC 985.35 de la determinación de minerales mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA). La norma ISO 17025:2017 establece los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, para comprobar la calidad de sus operaciones, que son competentes técnicamente y capaces de generar resultados válidos (ISO 17025:2017).

La verificación se define, como el conjunto de procesos desarrollados para asegurar el cumplimiento de los requisitos para el uso específico de métodos analíticos mediante examen y confirmación obteniendo evidencia objetiva (Camaró *et al.* 2014).

Es importante que el método que se desea verificar sea compatible con las condiciones del laboratorio de trabajo, además de ser documentado, y permitir que todos los analistas reciban la capacitación adecuada acerca del uso del método, en este caso el de minerales (Ocaña *et al.* 2020).

El hierro (Fe) es un mineral que está relacionado con el crecimiento y desarrollo físico y mental de niños y adultos. Ayuda a transportar oxígeno a los tejidos y mantiene el sistema inmunológico en buen estado, aumentando las defensas del organismo y generando una mayor resistencia a enfermedades (Rebellato *et al.* 2015). Las fuentes de alimentos altos en hierro incluyen carne (especialmente hígado), pescado, huevos, y hortalizas de hoja verde. Los granos de cereales, como maíz, arroz y trigo, contienen cantidades moderadas de hierro (FAO 2020).

El potasio (K) es un mineral que se encuentra en muchos alimentos tales como: frutas (pasas, bananos), verduras (papas, espinaca, tomate), lentejas, nueces, leche, yogurt, carnes, pescado, etc. El organismo necesita potasio para casi todo su funcionamiento, en especial para el buen funcionamiento del riñón y del corazón, la contracción muscular y la transmisión nerviosa (NIH 2019a).

El magnesio (Mg) es un cofactor en más de 300 sistemas enzimáticos que regulan diversas reacciones bioquímicas en el cuerpo, incluida la síntesis de proteínas, la función muscular y nerviosa, el control de la glucosa en sangre y la regulación de la presión arterial. Las verduras de hoja verde, como las espinacas, legumbres, nueces, semillas y los granos integrales, son buenas fuentes de este mineral (NIH 2019b).

El manganeso (Mn) es un mineral que el organismo necesita para mantenerse sano, para producir energía y proteger las células, para fortalecer los huesos, para la reproducción, la coagulación sanguínea y para mantener un sistema inmunitario sano. Algunas fuentes de manganeso son: granos integrales, algunos mariscos (almejas, ostras), frutos secos (avellanas, nueces), verduras de hoja, especias como pimienta negra, etc. (NIH 2019c).

Funcionalmente, el zinc (Zn) participa en la división y el crecimiento celular, la absorción de electrolitos intestinales, la neurotransmisión, la respuesta inmune, la actividad del timo y la visión (De Gianluca *et al.* 2015). Algunas fuentes de zinc son: ostras, carnes rojas, mariscos (cangrejo, langosta), cereales integrales y productos lácteos (NIH 2019d).

En marzo del presente año la FDA actualizó los valores diarios para cada nutriente siendo así: 18 mg para hierro, 4700 mg para potasio, 420 mg para magnesio, 2.3 mg para manganeso y 11 mg para zinc (FDA 2020). Por otro lado, las políticas de seguridad alimentaria de Honduras requieren que se determine y controle la ingesta diaria de minerales como calcio (Ca), hierro (Fe) y sodio (Na) por parte de la población hondureña, y que se declare en la etiqueta nutricional según el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 67.01.60:10.

El presente estudio tiene como finalidad poder expandir el alcance de la acreditación para el análisis de varios minerales (Fe, K, Mg, Mn y Zn), verificando el método y tomando como referencia el método oficial de la AOAC 985.35, mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Los objetivos del estudio fueron:

- Verificar el método de análisis de minerales AOAC 985.35 en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ) mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA).
- Determinar la incertidumbre expandida de la recuperación de cada uno de los minerales evaluados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), localizado en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el Valle del Yegüare, km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, departamento de Francisco Morazán, Honduras, C.A.

Materiales

Reactivos y solventes:

- Agua desionizada
- Soluciones estándar preparadas en el laboratorio según los métodos oficiales de la AOAC: 969.23 para K y 965.09 para Fe, Mg, Mn, Zn.
- Óxido de Lantano (La_2O_3) 99.99%
- Solución de Cloruro de Lantano (LaCl_3) al 1%
- Solución de Cloruro de Cesio (CsCl) al 10%
- Ácido nítrico al 20% y 1 M

Otros insumos

- Baking Chocolate (NIST, Standard Reference Material® 2384)
- Crisoles de cerámica
- Espátulas
- Matraces volumétricos Clase A de 50 mL
- Baño María
- Pipetas volumétricas Clase A de 5 mL, 10 mL y 30 mL.

Aparatos y equipos

- Horno de convección con aire forzado, capacidad para calentar a 105 °C
- Mufla, capacidad para calentar a 550 °C
- Espectrofotómetro de absorción atómica (EAA), ThermoScientific SOLAAR Series 949940030011

Metodología

Evaluación de la veracidad y recuperación (verificación entre analistas, repeticiones y réplicas). Se evaluó la cuantificación de minerales según el método AOAC 985.35. Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas para evaluar la exactitud del método, en donde las parcelas principales fueron los analistas A1, A2 y A3, las repeticiones R1 y R2 fueron las subparcelas y las variables fueron los minerales Fe, K, Mn, Zn y Mg (Cuadro 1). Los tratamientos (analistas) evaluaron la veracidad y recuperación del método en cada repetición para cada una de

las variables. Se realizaron para cada mineral 2 repeticiones con 6 réplicas cada una para los 3 analistas, obteniendo un total de 36 unidades experimentales.

Cuadro 1. Esquema experimental para el análisis de los minerales Fe, K, Mn, Zn y Mg.

Analista	Repetición	Réplicas
1	1	6
	2	6
2	1	6
	2	6
3	1	6
	2	6

La veracidad se evaluó en función del Valor Z absoluto, calculando este para cada uno de los resultados obtenidos, bajo la Ecuación 1. La recuperación fue calculada a partir de la Ecuación 2.

$$z = x_i - x/s \quad [1]$$

Donde:

z= valor Z absoluto

x_i = valor individual

x= media

s= desviación estándar

$$R\% = (x_o/x_e) * 100 \quad [2]$$

R%= % de recuperación

x_o = media obtenida

x_e = media esperada

El valor Z fue interpretado de la siguiente manera:

$|Z| \leq 2$ Satisfactorio

$2 < |Z| < 3$ Cuestionable

$|Z| \geq 3$ Insatisfactorio

Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad entre analistas y réplicas). Se evaluó la precisión entre analistas, expresada en función de la desviación estándar relativa (DER), según los límites establecidos en el método 985.35 de la AOAC (AOAC, 1985). Los límites establecidos para estos parámetros, para cada uno de los minerales se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Criterios de aceptación para minerales por el método oficial AOAC 985.35.

Parámetros de desempeño		Valores				
		K	Fe	Mn	Zn	Mg
Precisión	D.E.R. (%)	<2.0	<6.2	<11	<6.7	<4.4
Recuperación	%	±15	±15	±20	±20	±15
Veracidad	Valor Z absoluto	2	2	2	2	2

D.E.R. = Desviación Estándar Relativa.

K = potasio; Fe = hierro; Mn = manganeso; Zn = zinc; Mg = magnesio.

Otros detalles que se consideraron para la verificación del método fueron:

Cálculo de incertidumbre del método. La incertidumbre del método se expresa como porcentaje (U%) con un factor de cobertura $k=2$ al 95% de confianza. La incertidumbre expandida se calculó a partir de la incertidumbre estándar utilizando la Ecuación 3.

$$U = k * u \quad [3]$$

Donde:

k = factor de cobertura

u = incertidumbre estándar

Desarrollo. Para llevar a cabo la verificación de un método se requieren de cuatro fases, las cuales se mencionan a continuación (UNODC, 2010):

- Definición y especificaciones del método.
- Descripción, características del método y preparación de materiales.
- Demostración que el método es capaz de cumplir con los requisitos.
- Declaración sobre las condiciones y circunstancias que el método ha sido verificado y por lo tanto es aplicable.

FASE I. Definición y especificaciones del método. Se siguieron las directrices según el método oficial AOAC 985.35 para análisis de minerales en alimentos por espectrofotometría de absorción atómica, el cual tiene como principio destruir la matriz orgánica mediante la incineración en seco en una mufla. Las cenizas restantes se disuelven en ácido diluido y el analito se determina mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Con este análisis se busca determinar parámetros como veracidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad e incertidumbre, y se hace con el objetivo de comprobar si los valores de las concentraciones están dentro del rango o límites permitidos según el certificado del material de referencia utilizado.

FASE II. Descripción, características del método y preparación de materiales. En el método AOAC 985.35 se describen los procedimientos, preparación de muestras, equipos o materiales necesarios, reactivos y precauciones.

Preparación de la cristalería. Limpiar todo el material volumétrico utilizado mediante inmersión durante la noche en ácido nítrico (HNO_3) al 20 % (v/v). Lavar tres veces con agua destilada o agua desionizada.

Preparación de la muestra. Homogenizar la muestra de referencia (Baking Chocolate NIST, Standard Reference Material® 2384) ya que se encuentra en estado sólido y en forma de barra (rectangular), pesar 1 g en un crisol de cerámica y obtener las cenizas de la muestra.

Preparación de las cenizas. Se incinera la muestra en una mufla a 550 °C durante 5-8 h. Si la ceniza contiene partículas de carbono (es decir, que es de color gris), se realizan los siguientes pasos: Humedecer con 1 mL de agua desionizada y agregar 3 mL de ácido nítrico (HNO_3), secar en una estufa o en baño de vapor a 95 °C, e incinerar a 525 °C, 1-2 h.

A la ceniza contenida en el crisol, agregar 5 mL de HNO_3 al 1 M. Calentar en un baño de vapor o una estufa a 95 °C durante 2-3 minutos para disolver, añadir la solución a un matraz volumétrico de 50 mL, realizar lavados al crisol con dos porciones de 5 mL de HNO_3 al 1 M, y agregar al matraz volumétrico de 50 mL.

Preparación de estándares

Para Mg. Añadir 8.8 mL de solución de LaCl_3 1 % a la dilución final de 50 mL de cada estándar para obtener una concentración de 0.1% (p/v) de La. Si el volumen de la dilución final es diferente, hacer el cálculo correspondiente de la cantidad de LaCl_3 1 %.

Para K. Añadir 3.15 mL de solución de CsCl 10 % a la dilución final de 50 mL de cada estándar para obtener una concentración de 0.5% (p/v) de Cs. Si el volumen de la dilución final es diferente hacer el cálculo correspondiente de la cantidad de CsCl 10 %.

Preparación. Preparar las concentraciones de cada muestra dentro del rango lineal del instrumento, las cuales son indicadas en el Cuadro 3, en algunos casos se realizaron diluciones con agua desionizada para trabajar dentro del rango de concentración del equipo. Diluir con HNO_3 al 1M. Las diluciones adicionales necesarias deben ser calculadas dependiendo de la concentración teórica de cada mineral presente en el producto analizado. Se debe tomar en cuenta que la concentración final debe estar de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3. Preparar la curva de calibración para cada mineral tomando como referencia los parámetros establecidos, según el método oficial AOAC 985.35. Determinar las soluciones de ensayo de forma similar en el espectrofotómetro de absorción atómica y realizar los cálculos tomando en cuenta el peso de la muestra y las diluciones realizadas.

Cuadro 3. Rango lineal de concentraciones del EEA.

Elemento	Concentración (ppm)	Concentración (mg/100 g)	R ²
Hierro (Fe)	1 – 3	0.1 – 0.3	0.9986
Potasio (K)	1 – 3	0.1 – 0.3	0.9998
Manganeso (Mn)	2 – 20	0.2 – 2	0.9961
Zinc (Zn)	1 – 5	0.1 – 0.5	0.9978
Magnesio (Mg)	0.2 – 2	0.02 – 0.2	0.9999

Preparación de soluciones utilizadas

Solución de Cloruro de Lantano (LaCl₃) al 1%. Pesar 11.7 g (\pm 100 mg) de La₂O₃ y trasladarlo al matraz volumétrico de 1 L, añadir agua desionizada suficiente para remojar el polvo y luego agregar lentamente 50 mL de HCl concentrado (Precaución: Reacción exotérmica). Se debe dejar que el polvo se disuelva y luego se diluye hasta 1 L con agua desionizada, realizar un mezclado manual hasta que todo el polvo esté disuelto. Esta solución es estable hasta 6 meses si se almacena a temperatura ambiente.

Solución de Cloruro de Cesio (CsCl) al 10%. Pesar 12.7 g (\pm 100 mg) de CsCl y trasladarlo a un matraz volumétrico de 100 mL. Se debe diluir hasta obtener el volumen con agua desionizada y mezclar hasta que todo el polvo esté disuelto. La solución tiene una duración de 6 meses si se almacena a temperatura ambiente.

Cálculos

La concentración de cada mineral se calcula a partir del promedio de las lecturas obtenidas en cada réplica, y la concentración de cada una de estas se calcula con la Ecuación 4. El laboratorio cuenta con una hoja de cálculo (LAA-Fe225-1) que se utiliza para calcular automáticamente la concentración de cada mineral.

$$C = (L \times Fd - B) / P \quad [4]$$

Donde:

L: concentración detectada por el Software SOLAAR del espectrofotómetro de absorción atómica.

Fd: Factor de dilución.

B: Promedio de los blancos.

P: peso de la muestra.

FASE III. Demostración que el método es capaz de cumplir con los requisitos

En esta fase se utilizaron los datos obtenidos de cada análisis con el espectrofotómetro de absorción atómica, los cuales fueron registrados en una hoja de cálculo estadístico en el programa SAS® para determinar la media, desviación estándar y probabilidad de las concentraciones presentes en la muestra de referencia NIST SRM® 2384 (chocolate). Con los resultados obtenidos se determinó la veracidad, repetibilidad, precisión y reproducibilidad del método.

Para verificar la confiabilidad de los resultados obtenidos, se realizó la comparación con el certificado oficial del NIST del material de referencia utilizado, en este caso el Chocolate (SRM® 2384). En el Cuadro 4 se pueden observar los valores certificados emitidos para cada mineral.

Cuadro 4. Valores de fracción de masa certificados para cada elemento (NIST, 2020).

Elemento	mg/100g
Hierro (Fe)	13.2 ± 1.1
Potasio (K)	865 ± 40
Manganeso (Mn)	2.08 ± 0.13
Zinc (Zn)	3.76 ± 0.19
Magnesio (Mg)	261 ± 12

FASE IV. Declaración sobre las condiciones y circunstancias que el método ha sido validado y por lo tanto es aplicable

Se planificará una auditoría interna para verificar este método, y se utilizará el formato de auditoría interna de la calidad, para esto se estableció un plan y un análisis para cuantificar los minerales: Plan de verificación para determinar minerales y un análisis de minerales (según método oficial AOAC 985.35)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las medias obtenidas por analista para cada uno de los minerales se muestran en el Cuadro 5, según el material de referencia utilizado para la verificación (Baking chocolate SRM® 2384), todas las medias obtenidas en el experimento se encuentran dentro del límite permitido, como se muestra en el Cuadro 4 (NIST 2020).

Cuadro 5. Medias obtenidas para los distintos minerales por analista.

Analista	Concentración (mg/100g)				
	Potasio	Hierro	Manganeso	Zinc	Magnesio
	Media ± D.E.				
Analista 1	897.90 ± 3.92	12.77 ± 0.57	2.07 ± 0.12	3.72 ± 0.13	260.61 ± 12.25
Analista 2	892.74 ± 7.37	12.49 ± 0.17	1.97 ± 0.02	3.76 ± 0.10	251.92 ± 0.51
Analista 3	891.26 ± 9.30	12.25 ± 0.10	2.05 ± 0.09	3.90 ± 0.03	251.34 ± 1.48
C.V. (%)	4.27	4.83	7.22	5.12	4.10

D.E.: Desviación Estándar.

C.V.: Coeficiente de Variación.

La repetibilidad, tomando en cuenta como parámetro de desempeño la precisión del ensayo realizado por cada uno de los analistas se expresó en función de la desviación estándar, y los valores obtenidos que se muestran en el Cuadro 6, son cercanos a los establecidos en el certificado del material de referencia SRM® 2384 Baking Chocolate, esto significa que, para cada mineral, cada uno de los analistas obtuvieron valores cercanos entre sí (NIST 2020).

Cuadro 6. Valores de repetibilidad obtenidos por cada analista.

Analista	Repetibilidad (mg/ 100g)				
	Potasio	Hierro	Manganeso	Zinc	Magnesio
Analista 1	43.78	0.93	0.21	0.20	16.16
Analista 2	37.67	0.60	0.08	0.21	05.38
Analista 3	29.40	0.35	0.22	0.13	13.03

La precisión se evaluó en función de desviación estándar relativa (DSR), los resultados obtenidos y sus valores esperados, se muestran en el Cuadro 7, estos se encuentran por debajo del límite permitido según la AOAC (Cuadro 2), esto indica que hubo un grado de concordancia alto entre los resultados obtenidos para cada uno de los minerales (MEFT 2018).

Cuadro 7. Valores de precisión para cada uno de los minerales

Mineral	DSRo	DSRe
Potasio	4.02	<6.8
Hierro	5.41	<8.4
Manganeso	8.88	<14.0
Zinc	5.03	<8.0
Magnesio	4.94	<6.8

DSRo: Desviación estándar relativa obtenida.

DSRe: Desviación estándar relativa esperada.

Los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos y los valores esperados de los mismos, se muestran en el Cuadro 8. Todos los porcentajes de recuperación se encuentran dentro del rango establecido por la AOAC (Cuadro 2), así que se puede concluir que el método tiene un buen porcentaje de recuperación.

La veracidad se evaluó para el método con el fin de brindar certeza de los datos, se comprobó mediante el cálculo del Valor $|Z|$; siendo sus parámetros: $|Z| \leq 2$ es satisfactorio, si $2 < |Z| < 3$ es cuestionable y si $|Z| \geq 3$ es insatisfactorio (AOAC 1985). Se pudo comprobar que en promedio los valores Z obtenidos dieron valores menores a 2, pero analizándolos individualmente se encontraron nueve datos cuestionables, y cuatro no satisfactorios. Aunque estos valores no influyeron significativamente en los resultados se nota que existe alguna fuente de variación en el método. Se debe seguir verificando este método para lograr identificar dicha fuente, además, los analistas deben someterse a un proceso de capacitación, ya que incluso ellos pueden ser la razón principal en la obtención de estos valores Z fuera de rango.

Cuadro 8. Valores de recuperación (%) para cada uno de los minerales.

Mineral	Recuperación_o (%)	Recuperación_e (%)
Potasio	103	±15
Hierro	94.7	±15
Manganeso	97.5	±20
Zinc	100.9	±20
Magnesio	97.5	±15

Cada valor de fracción de masa certificado, es la media combinada de la media de los resultados de los análisis del NIST y, la media o mediana de los resultados proporcionados por laboratorios colaboradores. Los valores se expresan como $x \pm U95\%$, donde x es el valor certificado y U95% es la incertidumbre expandida, es decir que el valor real del analito se encuentra dentro del intervalo x con un 95% de confianza (NIST, 2020).

Los valores de incertidumbre (U) mostrados en el Cuadro 9, se expresaron con un factor de cobertura $k=2$ al 95% de confianza, entre más pequeño el valor de la incertidumbre mejor es la

calidad de los resultados. Si se quisiera disminuir el valor de incertidumbre se deben identificar las fuentes de esta para controlar la variación de resultados en futuros análisis (Rodríguez *et al.* 2012).

Cuadro 9. Valores de incertidumbre (%) para cada uno de los minerales.

Mineral	U%
Potasio	±08.04
Hierro	±10.80
Manganeso	±17.80
Zinc	±10.10
Magnesio	±09.90

Se realizó un ANDEVA ($P > 0.05$) para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre analistas, entre repeticiones, entre réplicas, o en las interacciones entre los analistas con las repeticiones y réplicas.

Al observar los resultados obtenidos en el Cuadro 10 para cada mineral, con probabilidades abajo de 0.05 se puede concluir que no existieron diferencias significativas entre analistas, repeticiones, réplicas, interacciones analista-repetición e interacciones analista-réplica, lo cual indica que el experimento se llevó a cabo sin ninguna fuente de variación significativa que pudiera afectar los resultados del análisis.

Cuadro 10. Probabilidades del ANDEVA para la recuperación de minerales.

Fuente	Probabilidad				
	Potasio	Hierro	Manganeso	Zinc	Magnesio
Analista	0.9054	0.1471	0.2557	0.1057	0.0826
Repetición	0.6437	0.2623	0.0621	0.1754	0.1483
Réplica	0.7265	0.3211	0.0521	0.7448	0.0678
Analista*Réplica	0.3019	0.3013	0.4104	0.6858	0.4977
Analista*Repetición	0.8131	0.1316	0.4568	0.3308	0.0790
C.V. (%)	4.27	4.83	7.22	5.12	4.10

C.V.: Coeficiente de Variación.

Sin embargo, se notó un riesgo de significancia en dos fuentes de variación para manganeso y una para magnesio. Esta observación se analizó más de cerca, por cada uno de los analistas y se determinó que se debe a los valores Z obtenidos individualmente por cada uno de ellos. Para manganeso, el analista 1 obtuvo dos valores no satisfactorios ($|Z| \geq 3$) y el analista 3 obtuvo cuatro valores cuestionables ($2 < |Z| < 3$). Para magnesio, el analista 3 obtuvo tres valores cuestionables ($2 < |Z| < 3$).

Esto indica que en esas réplicas los analistas no controlaron las fuentes de variación, y estas influyeron en el resultado. Aunque no tengan un efecto representativo en los resultados del estudio,

es necesario que se proceda con un plan de capacitación a los empleados para controlar la variación en sus resultados.

4. CONCLUSIONES

- Se verificó el método de análisis de minerales en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ) mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) tomando como referencia el método oficial AOAC 985.35.
- Se determinó que la incertidumbre de los resultados obtenidos en el ensayo, por cada uno de los minerales, se encuentra dentro de los límites aceptables para que este método pueda ser implementado en el laboratorio de análisis de alimentos Zamorano (LAAZ).

5. RECOMENDACIONES

- Realizar una verificación posterior para los minerales sodio (Na) y calcio (Ca), los mismos que no pudieron ser incluidos en el presente estudio, ya que necesitan una revisión del método para que generen resultados confiables.
- Realizar verificaciones periódicas utilizando el mismo método de análisis de minerales y así generar una mayor confiabilidad del método, de esta forma se contribuye con el proceso de acreditación de la Norma ISO 17025:2017.
- Realizar nuevas verificaciones siempre que existan en el laboratorio cambios en factores que puedan incidir en los resultados del método, como analistas, equipos, reactivos, etc.
- Revisar si la incertidumbre del método es mayor a 0.3 veces la incertidumbre estándar del material de referencia para reestimar los valores Z prima considerando la incertidumbre del laboratorio.
- Participar en pruebas inter-laboratorios para verificar la veracidad de los resultados.

6. LITERATURA CITADA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. Minerals in infant formula, enteral products, and pet foods. Atomic absorption spectrophotometric method. AOAC International. [consultado el 11 de ago de 2020]. Cap 50.1.14.
- Camaró ML, Martínez R, Olmos P, Catalá V, Ocete MD, Gimeno C. 2014. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. [consultado el 16 de jul de 2020]. 33(7): 31-36.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2020: Minerales. [consultado el 20 de ago de 2020] Cap 10. <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0e.htm>
- [FDA] Food and Drug Administration. 2020. Valor diario y porcentaje de valor diario: cambios en las nuevas etiquetas de información nutricional y complementaria. United States: Food and Drug Administration. [consultado el 28 de jul de 2020]. <https://www.fda.gov/media/137914/download>
- Garza J. 2017. Norma ISO 17025: Requisitos, prácticas y ventajas de su implementación [internet]. México: Analitek. [actualizado: 17 de ene de 2017]. [consultado el 5 de jul de 2020]. <http://sglab.net/wp-content/uploads/2017/04/Normas-ISO-17025.pdf>
- Gianluca T, Berni R, Di Chiara M, Pietravalle A, Aleandri V, Conte F, De Curtis M. 2015. Zinc in early life: A key element in the fetus and preterm neonate. PubMed: última revisión: 11 de dic de 2015. [consultado el 29 de jul de 2020]. 7 (12): 10427-46. doi: 10.3390 / nu7125542.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. United States: International Organization for Standardization. [actualizado en 2017]. [consultado el 1 de ago de 2020]. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>
- James T Tanner, Stephen A Barnett, Methods of Analysis for Infant Formula: Food and Drug Administration and Infant Formula Council Collaborative Study, Journal of Association of Official Analytical Chemists, Volume 68, Issue 3, 1 May 1985, Pages 514–522. [consultado el 8 de jun de 2020]. <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.3.514>
- Lazos RJ, Hernández I. 2004. La validación de métodos: un enfoque práctico. El Marqués, Qro., México. Centro Nacional de Metrología. [consultado el 21 de jun de 2020]. <https://www.cenam.mx/simposio2004/memorias/TA-090.pdf>
- Lewis J. 2018. Introducción al papel del sodio en el organismo. [Última revisión completa: sep de 2018]. MSD y los manuales MSD. MD, Brookwood Baptist Health and Saint Vincent's Ascension Health, Birmingham. [consultado el 2 de jul de 2020]. <https://www.msmanuals.cn/es/hogar/trastornos-hormonales-y-metab%C3%B3licos/equilibrio-electrol%C3%ADtico/introducci%C3%B3n-al-papel-del-sodio-en-el-organismo>
- Martínez E. 2016. El calcio, esencial para la salud: Nutrición Hospitalaria. Madrid: vol. 33: 26-31. [consultado el 12 de jun de 2020]. ISSN 0212-1611. <http://dx.doi.org/10.20960/nh.341>

- [MEFT] Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. 2018. Guía de validación de métodos analíticos. Manual de Inocuidad y Certificación. Sernapesca. Febrero de 2018. [consultado el 9 de jul de 2020]. http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/f59_guia_de_validaciones_de_metodos_analiticos_08.02.18.pdf
- [NIH] National Institutes of Health. 2019a. Datos sobre el potasio. 10 Center Dr, Bethesda, MD 20814, Estados Unidos. [Última revision: 05 de mar de 2019] [consultado el 04 de jul de 2020]. <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Potassium-DatosEnEspanol.pdf>
- [NIH] National Institutes of Health. 2019b. Magnesium: fact sheet for health professionals. 10 Center Dr, Bethesda, MD 20814, Estados Unidos. [Última revision: 02 de feb de 2019] [consultado el 04 de jul de 2020]. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-HealthProfessional/#en1>
- [NIH] National Institutes of Health. 2019c. Datos sobre el manganeso. 10 Center Dr, Bethesda, MD 20814, Estados Unidos. [Última revision: 08 de oct de 2019] [consultado el 04 de jul de 2020]. <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Manganese-DatosEnEspanol.pdf>
- [NIH] National Institutes of Health 2019d. Datos sobre el zinc. 10 Center Dr, Bethesda, MD 20814, Estados Unidos. [Última revision: 18 de dic de 2019] [consultado el 04 de jul de 2020]. <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Zinc-DatosEnEspanol.pdf>
- [NIST] National Institute of Standards and Technology. 2020. Certificate of Analysis. Standard Reference Material® 2384 Baking Chocolate. Gaithersburg, MD. [Última revision: 15 de ene de 2020]. [consultado el 8 de jul de 2020]. <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/2384.pdf>
- Ocaña MF, López MG, Van CG, Hernández M. 2020. Importancia de la validación y verificación de los métodos analíticos para determinación de TGO, TGP, proteínas totales y albúmina por método espectrofotométrico semi-automatizado en un laboratorio de investigación farmacológica preclínica. Xalapa, Veracruz: Universidad Veracruzana. [consultado el 15 de jul de 2020]. https://www.academia.edu/15040860/Importancia_de_la_validaci%C3%B3n_de_los_m%C3%A9todos_anal%C3%ADticos_para_determinaci%C3%B3n_de_TGO
- [OHA] Organismo Hondureño de Acreditación. 2019. Política sobre la validación de métodos. Tegucigalpa. Versión 02: 1-23. [actualizado: 30 de ene de 2019]. [consultado el 20 de jul de 2020]. <http://oha.hondurascalidad.org/wp-content/uploads/2019/03/OHA-MC-P06-V02-Pol%C3%ACTica-sobre-validaci%C3%B3n-de-M%C3%A9todos.pdf>
- Rebellato A, Pacheco B, Prado J, Lima J. 2015. Iron in fortified biscuits: A simple method for its quantification, bioaccessibility study and physicochemical quality. *Food Research International*, 77 (3): 385-391. [consultado el 18 de ago de 2020]. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.09.028.
- [RTCA] Reglamento Técnico Centroamericano. 2019. Etiquetado nutricional de productos alimenticios preenvasados para consumo humano para la población a partir de 3 años de edad [internet]. [actualizada el 03 de jul de 2019]. Editada por: Ministerio de Economía MINECO, Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica OSARTEC, Ministerio de

- Fomento, Industria y Comercio MIFIC, Secretaría de Industria y Comercio SIC, Ministerio de Economía, Industria y Comercio MEIC. [consultado el 16 de ago de 2020]. <http://infotrade.minec.gob.sv/ca/wp-content/uploads/sites/7/2019/03/Anexo-RES-281-2012-RTCA-67016010-Etiquetado-nutricional-preenvasado-3-a%C3%B1os-edad.pdf>
- Rodríguez SC, Pellerato RG, Romero CH, Acevedo HA, Vázquez FA. 2012. Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura. Av. Libertad 5450-3400 Corrientes, Argentina. [consultado el 27 de ago de 2020]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4550292>
- Sorroza NA, Jinez BE, Grijalva AM, Naranjo JL. 2019. El Cloruro de sodio (NaCl) y los efectos en la Alimentación. Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento. Vol. 3 núm.1, enero, ISSN: 2588-073X, 2019, pp. 913-937. DOI: 10.26820/recimundo/3.(1).enero.2019.913-937. [consultado el 25 de jul de 2020]. URL: <http://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/398>
- [UNODC] Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. 2010. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Sección de laboratorio y asuntos científicos Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Nueva York. [consultado el 3 de ago de 2020]. https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- [WHO] World Health Organization. 2020. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Health Product Policy and Standards. 21 de abril de 2020. [consultado el 25 de jul de 2020] ISBN: 978-92-4-000182-4.
- Zúñiga E. 2010. Diseño en parcelas divididas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. [consultado el 25 de jun de 2020]. URL: http://estadistica.260mb.com/Efrain_DPD.pdf?i=1

7. ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de longitud de onda y flama para determinación de minerales.

Elemento	Longitud de onda, nm	Flama
Hierro (Fe)	248.3	Aire-Acetileno
Potasio (K)	766.5 – 769.9	Aire-Acetileno
Manganeso (Mn)	279.5	Aire-Acetileno
Zinc (Zn)	213.9	Aire-Acetileno
Magnesio (Mg)	285.2	Aire-Acetileno

Anexo 2. Plan de verificación de minerales.

Anexo 2.

Plan de verificación

Determinación de Minerales por el método

LAA-1225-1

AOAC 985.35

Emitido el 2020.20.10

Versión 01

Referencias: LAA-DE048 (método AOAC 985.35)

1. Objetivo y alcance

Método	Análito	Matriz(es)	Rango de trabajo/concentración	Modificaciones*	Acción
AOAC 985.35	Fe, K, Mn, Zn, Mg	Fórmula infantil, productos enteros, comidas para animales	No especificado	Ninguna	Validación

2. Responsables

Asignación	Responsable(s)	Asignación	Responsable(s)
Planeación	S. Vivas	Ejecución de experimentos	L. Maldonado/ E. Salgado/ S. Vivas
Revisión del plan	L. Maldonado/ E. Salgado	Evaluación de resultados	L. Maldonado/ E. Salgado
Aprobación del plan	L. Maldonado	Declaración de conformidad	L. Maldonado

3. Especificaciones

3.1 Patrones y materiales de referencia

Descripción	Especificaciones y certificado
3.1.1. Baking chocolate	Certificado NIST SRM® 2384

3.2 Equipo

3.2.1. Software

Descripción	Hoja de cálculo/versión
a Microsoft Excel®, office 2016	Hoja de cálculo de minerales LAA-Fe225-1
b Sistema de análisis estadístico SAS/STAT® versión 9.1	Utilizado para la realización de los análisis de varianza y separación de medias para los factores: analista, muestra y repetición.

3.2.2. Aparatos y equipos de medición

Descripción (nombre, modelo o código de equipo)	Instrucciones de uso, mantenimiento y verificación
a Horno de convección con aire forzado	
b Mufla	
c Espectrofotómetro de absorción atómica [EAA]	

Editado por: S. Vivas

Revisado por: L. Maldonado

Aprobado por: L. Maldonado

Emitido el 2020.20.10

Página 1 de 7

Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. San Antonio de Oriente, F.A. Apartado postal 01. Teléfono (504) 287-2100, ext. 2205, Fax (504) 776-6244

Descripción (nombre, modelo o código de equipo)	Instrucciones de uso, mantenimiento y verificación
d Baño María	
e Crisoles de cerámica	

3.3 Reactivos y solventes

Descripción	Especificaciones
3.3.1. Ácido nítrico	Pureza de % grado reactivo. marca catalogo
3.3.2. Óxido de Lantano	La ₂ O ₃ , 99,99%; Calidad AAS
3.3.3. Solución de Cloruro de Lantano	LaCl ₃ , 1% (w/v). Pesar 11,7 g (± 100 mg) La ₂ O ₃ y trasladarlo al matraz volumétrico de 1 L, añadir agua suficiente para mojar el polvo y luego agregar lentamente 50 mL de HCl concentrado (Precaución: Reacción exotérmica.). Deje que el polvo se disuelva y luego diluya hasta 1 L con agua, mezclar. Esta solución es estable hasta 6 meses si se almacena a temperatura ambiente.
3.3.4. Solución de Cloruro de Cesio	CsCl, 10% (w / v). Pesar 12,7 g (± 100 mg) de CsCl y trasladarlo a un matraz volumétrico de 100 mL. Diluya hasta obtener el volumen con agua y mezclar. La solución tiene una duración de 6 meses.
3.3.5. Agua desionizada	Desionizada con 18 MQ de resistividad, para la preparación de reactivos, soluciones estándar o de prueba.
3.3.6. Soluciones estándar para cada mineral	Según los métodos oficiales de la AOAC: 969.23 para K y 965.09 para Fe, Mg, Mn, Zn.

3.4 Otros insumos

Descripción	Especificaciones (si aplica)
3.4.1. Matraz volumétrico	Clase A de 50 mL
3.4.2. Pipetas volumétricas	Clase A de 5 mL, 10 mL y 30 mL
3.4.3. Espátula	Acalanada , de metal
3.4.4. Tubos de ensayo	Plásticos
3.4.5. Gradilla	De metal o plástico
3.4.6. Desecador	
3.4.7. Pinzas	De metal

3.5 Equipo de protección personal

Descripción	Especificaciones (si aplica)
3.5.1. Gabacha	
3.5.2. Guantes	De nitrilo, espesor 5 mil.

Editado por: S. Vivas

Revisado por: L. Maldonado

Aprobado por: L. Maldonado

Emitido el 2020.20.10

Página 2 de 7

Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. San Antonio de Oriente, F.A. Apartado postal 01. Teléfono (504) 287-2100, ext. 2205, Fax (504) 776-6244

Continuación Anexo 2.

Descripción	Especificaciones (si aplica)
3.5.3. Mascarilla	Con filtro para vapores orgánicos, 3M 6002.

3.6 Instalaciones y condiciones ambientales

Cuarto/unidad operativa	Parámetro	Especificaciones/referencia
3.6.1. Cuarto 04. Área de Balanzas	Humedad Relativa	≤ 80% a 30°C
	Temperatura ambiental	10 a 30°C
3.6.2. Cuarto 08. Análisis de minerales	Humedad Relativa	≤ 80%
	Temperatura ambiental	15 a 40°C

4. Fundamento del método (métodos empíricos y métodos propios)

La matriz orgánica se destruye mediante la incineración en seco en una mufla. La ceniza restante se disuelve en ácido diluido y el analito se determina mediante espectrofotometría de absorción atómica.

5. Procedimiento de ensayo

Conforme al LAA-DE048 (AOAC 985.35)

Instrucciones de seguridad

El ácido nítrico es un ácido fuerte y puede causar quemaduras severas. Se debe usar delantal cuando se trabaje con este ácido. Siempre agregar el ácido al agua y no a la inversa. Mantener alejado de combustibles ya que puede provocar incendios.

Toda la cristalería utilizada debe ser cuidadosamente lavada con ácido nítrico y agua desionizada para evitar sesgos positivos en los resultados.

La muestra debe ser incinerada para destruir la matriz orgánica.

6. Especificación de parámetros de desempeño

Parámetro	Criterio	Referencia	Nº Experimento	Observaciones
Veracidad	Sesgo ±2% $\delta < \mu_{95\%}$	Hibbert, 2007	02	
Repetibilidad	$RSD_{(r)} \leq 3\%$ $t_{exp} < t_{tab}$ (ANOVA)	Ver nota 1	02	Ver nota 1
Reproducibilidad	$RSD_{(R)} \leq 5\%$ $F_{exp} < F_{tab}$ (ANOVA)	Ver nota 1	03	Ver nota 1

Exclusiones de parámetros de desempeño

El método se basa en una medición de minerales, indistintamente de su fuente. Por tanto, se considera innecesaria la evaluación de la selectividad.

Notas

1 Se determina que el método es repetible/reproducible si no se evidencian diferencias significativas entre las mediciones en las condiciones de precisión establecidas, con 95 % de confianza.

7. Diseños experimentales

Experimento 01: Evaluación de la veracidad y recuperación (verificación entre analistas y matrices)

Se evaluó la cuantificación de minerales según el método AOAC 985.35. Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas para evaluar la verificación del método, en donde las parcelas principales fueron los analistas A1, A2 y A3, las repeticiones R1 y R2 fueron las subparcelas y las variables fueron los minerales Fe, K, Mn, Zn y Mg. Los tratamientos (analistas) evaluaron la veracidad y recuperación del método en cada repetición para cada uno de las variables. Se realizaron 6 duplicados por analista en cada repetición en un mismo día, la verificación se realizó en 3 días en donde se obtuvo un total de 6 lotes para los cuales se evaluaron 6 duplicados y los estándares para medir eficiencia y recuperación por analista.

La matriz se codificará como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Código de matriz (Material de referencia)

ELEMENTO	CÓDIGO
Balón Chocolate	MR

El experimento se realizará como se muestra en la Figura 1:

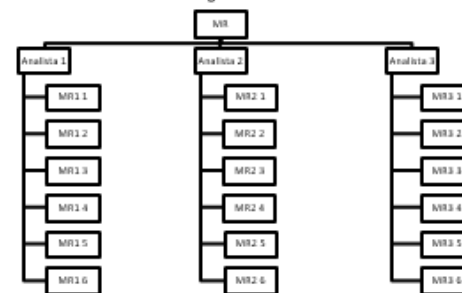


Figura 1. Esquema experimental para evaluación de veracidad – ANALISTAS Y MATRICES

Se calculan las medias y desviaciones estándar por analista y se comparan mediante pruebas de ANDEVA al 95 % de confianza. Si no se evidencian diferencias significativas, se calcula una media y una desviación estándar globales y se evalúa el sesgo de la siguiente forma:

- Se calcula el sesgo por diferencia absoluta entre la media experimental y el valor indicado en el certificado del material de referencia.

$$\text{Ecuación 1} \quad \delta = |C_{exp} - C_{MR}|$$

δ: sesgo; (C_{exp} : medición experimental y un; C_{MR} : valor de referencia).

- Se evaluará por un test de **Student** si el sesgo es significativamente mayor a la incertidumbre del material de referencia, siguiendo estas ecuaciones:

Continuación Anexo 2.

Ecuación 2
$$t_{exp} = \frac{\delta}{\mu_{bias}}$$

μ_{bias} : ver ecuación 3.

Ecuación 3
$$\mu_{bias} = \sqrt{\frac{S_p^2}{n} + \mu_{CRM}^2}$$

μ_{CRM}^2 : es el cuadrado de la incertidumbre declarada en el certificado del material de referencia. S_p^2 : Varianza de las mediciones; n : número total de mediciones.

Se determinan los valores **outlier**, aplicando el test de **Grubbs**, se calcula el G experimental aplicando la siguiente formula:

Ecuación 4
$$G_{exp} = \frac{|x_i - \bar{X}|}{s}$$

\bar{X} es la media del conjunto de mediciones, x_i es un dato individual y s es la desviación estándar.

Experimento 02: Precisión y recuperación (Repetibilidad y reproducibilidad entre muestras y analistas)

Para realizar la validación, se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas en donde las parcelas principales fueron los analistas (A1, A2 y A3) y las subparcelas fueron los días y la matriz. Se evaluó la precisión y recuperación entre analistas, el ensayo se realizó durante 3 días en los cuales se prepararon 6 lotes, cada lote con la matriz de prueba y los patrones de referencia para medir eficiencia y recuperación por analista, con el fin de evaluar la precisión de los analistas.

En la figura 2 se muestra de forma gráfica cómo será el diseño experimental para realizar la validación para la matriz MR Baking Chocolate

Figura 1. Esquema experimental para evaluación de precisión – ANALISTAS Y MATRICES

Tabla 1. Código de matriz (Material de referencia)

Analista	Repetición	D1	D2	D3	D4	D5	D6
1	1	A ₁ R ₁₁	A ₁ R ₁₂	A ₁ R ₁₃	A ₁ R ₁₄	A ₁ R ₁₅	A ₁ R ₁₆
	2	A ₁ R ₂₁	A ₁ R ₂₂	A ₁ R ₂₃	A ₁ R ₂₄	A ₁ R ₂₅	A ₁ R ₂₆
2	1	A ₂ R ₁₁	A ₂ R ₁₂	A ₂ R ₁₃	A ₂ R ₁₄	A ₂ R ₁₅	A ₂ R ₁₆
	2	A ₂ R ₂₁	A ₂ R ₂₂	A ₂ R ₂₃	A ₂ R ₂₄	A ₂ R ₂₅	A ₂ R ₂₆
3	1	A ₃ R ₁₁	A ₃ R ₁₂	A ₃ R ₁₃	A ₃ R ₁₄	A ₃ R ₁₅	A ₃ R ₁₆
	2	A ₃ R ₂₁	A ₃ R ₂₂	A ₃ R ₂₃	A ₃ R ₂₄	A ₃ R ₂₅	A ₃ R ₂₆

A: analista; R: repetición; D: duplicado

Se determina si existen diferencias significativas entre los resultados de cada analista y entre cada día, mediante una prueba de ANOVA de dos factores al 95 % de confianza.

Cálculo de incertidumbre de materiales de referencia AOCS

La incertidumbre en los materiales de referencia se expresa como una incertidumbre expandida **U** con un factor de cobertura **k=2** al 95% de confianza.

La incertidumbre expandida se calcula a partir de la incertidumbre estándar utilizando la fórmula:

Ecuación 5
$$U = k \cdot u$$

Donde: **k** es el factor de cobertura y **u** es incertidumbre estándar.

La incertidumbre estándar de los materiales de referencia es evaluada como una incertidumbre tipo A, debido a que se deriva de un número finito de mediciones, esta se calcula con la fórmula:

Ecuación 6
$$u = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde: **s** es la desviación estándar del conjunto de datos y **n** es el número de mediciones.

El número de mediciones para realizar el cálculo de la incertidumbre de los materiales de referencia, se obtienen del certificado de cada uno, omitiendo valores **outlier**.

Se determinan los valores **outlier**, aplicando el test de **Grubbs**, se calcula el G experimental aplicando la siguiente formula:

Ecuación 7
$$G_{exp} = \frac{|x_i - \bar{X}|}{s}$$

Donde: \bar{X} es la media del conjunto de mediciones, x_i es un dato individual y s es la desviación estándar.

8. Evaluación de la incertidumbre

Modelo de cálculo y fuentes de incertidumbre

Mensurando: Minerales
Modelo

Continuación Anexo 2.

Modelo de cálculo y fuentes de incertidumbre

Ecuación 8 **Minerales, mg/100g = (C/n)**

C: Concentración mg/ml del ~~cuadro~~ n: número de repeticiones realizadas

Ecuación 8 **C* = (L*Fd - B) / P**

L: lectura de absorbancia leída por el Software SOLAAR del espectrofotómetro de absorción atómica; Fd: Factor de dilución; B: Promedio de los blancos; P: peso de la muestra

Nota*: El laboratorio cuenta con una base de datos que calcula automáticamente la concentración de minerales.

Va: Volumen del ácido utilizado para aforar la muestra; Fe, K, Mn, Zn, Mg: masa atómica de los elementos

Variable/fuente I	Variable/fuente II	Variable/fuente III	Tipo	Estimación/referencia
Repetibilidad				Experimento 02
Va*	Tolerancia			Especificación de la bureta
	calibración			Certificado de calibración
	Expansión	Temperatura ambiental		
Fe, K, Mn, Zn, Mg	Masa atómica			IUPAC 2009 Estándares de peso atómico

Notas y excepciones:
*no se cuenta actualmente con datos suficientes para estimar la deriva.

9. Registros

Los resultados experimentales se registrarán en LAA-1225-1 y en la hoja de cálculo de minerales LAA-Fe225-1

10. Programa de actividades

Mes	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Semana	4	3	4	1	2
Gestión de recursos	X				
Verificación previa	X				
Experimento 1		X	X		
Experimento 2			X	X	
Experimento 3				X	X
Entrega de informe					X

Registro de modificaciones

Historial

Fecha	Modificación

Modificaciones en la versión actual

Utilice este cuadro para registrar modificaciones que requieran explicaciones detalladas

Cláusula	Modificación	Modificado por	Aprobado por