

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Validación de un método analítico para la determinación de sodio, calcio y zinc en sueros de rehidratación oral por medio del equipo de espectrofotometría de absorción atómica de llama

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Eva Darlene Vásquez Barillas para optar al grado académico de Licenciada en Química

Guatemala  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

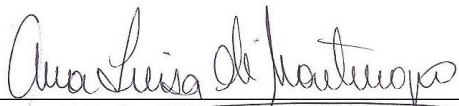


Validación de un método analítico para la determinación de sodio, calcio y zinc en sueros de rehidratación oral por medio del equipo de espectrofotometría de absorción atómica de llama

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Eva Darlene Vásquez Barillas para optar al grado académico de Licenciada en Química

Guatemala  
2022

Vo. Bo.

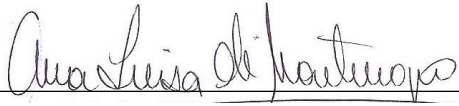
(f)  \_\_\_\_\_

Lic. Ana Luisa Mendizábal Solé de Montenegro

Tribunal Examinador:

(f)  \_\_\_\_\_

M.A. Irma Patricia Orellana Catalán

(f)  \_\_\_\_\_

Lic. Ana Luisa Mendizábal Solé de Montenegro

(f)  \_\_\_\_\_

Ing. Ingrid Yurrita Pocasangre

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre de 2022.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Osmín, Eva y Raquel, por su amor y apoyo incondicional, sin los cuales no hubiera podido lograr esta meta.

A Dios, por siempre brindarme sabiduría, protección y guía.

A mi asesora, Lic. Ana Luisa Mendizábal, por su ayuda y orientación en el desarrollo de este trabajo, con el cual me permitió aprender mucho más de lo estudiado en esta investigación y aportó a mi crecimiento como profesional.

A M.A. Irma Orellana y al Departamento de Química de la Universidad del Valle de Guatemala, por brindarme los reactivos, equipo y el uso de laboratorios para realizar esta investigación.

A los profesores que me compartieron su conocimiento y fortalecieron mi pasión por la química.

Al resto de mis seres queridos, a todas las personas excepcionales que conocí a lo largo de mi carrera universitaria, en especial a Sebastián por su apoyo, paciencia y ánimo en todo momento.

# ÍNDICE

	Página
Lista de cuadros .....	i
Lista de figuras .....	iii
Resumen .....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS .....	2
A. GENERAL.....	2
B. ESPECÍFICOS.....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	3
IV. MARCO TEÓRICO .....	4
A. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE METALES .....	4
1. Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado. ....	4
2. Espectroscopia de absorción atómica. ....	4
B. VALIDACIÓN DE MÉTODOS.....	7
1. Precisión.....	8
2. Exactitud .....	8
3. Especificidad .....	8
4. Límite de detección .....	9
5. Límite de cuantificación .....	9
6. Linealidad intervalo .....	9
7. Rango de medición .....	9
C. SUEROS DE REHIDRATACIÓN ORAL.....	9
1. Importancia de los electrolitos en el cuerpo humano .....	10
2. Composición química de los sueros de rehidratación oral.....	10
V. MARCO METODOLÓGICO .....	11
A. MATERIALES .....	11
B. POBLACIÓN Y MUESTRA .....	11
C. VARIABLES DE INVESTIGACIÓN .....	12
D. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	12
E. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	12
1. Validación del método. ....	12
2. Implementación del método.....	16
F. PROPUESTA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	17
1. Linealidad y rango. ....	17
2. Exactitud. ....	17
3. Precisión en condiciones de repetibilidad.....	17
4. Límite de detección.....	18
5. Límite de cuantificación. ....	18
6. Especificidad.....	18
VI. RESULTADOS .....	19
VII. DISCUSIÓN .....	23
A. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	23

VIII.	CONCLUSIONES .....	27
IX.	RECOMENDACIONES.....	28
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	29
XI.	ANEXOS .....	32
A.	FIGURAS .....	32
D.	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PARA EL FUNCIONAMIENTO BÁSICO DEL ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA PERKIN ELMER PINAACLE 900F....	43
E.	PROCEDIMIENTO PARA VERIFICACIÓN DE PIPETAS.....	45
F.	PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA DE CRISTALERÍA .....	46

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Reactivos para la preparación de soluciones madre para cada analito.....	13
Cuadro 2. Preparación de soluciones hijas de cada analito.....	13
Cuadro 3. Preparación de los estándares de cada analito.....	14
Cuadro 4. Condiciones para la lectura de analitos en los estándares.....	14
Cuadro 5. Preparación de soluciones para evaluar la exactitud.....	15
Cuadro 6. Preparación de soluciones intermedias a partir de las muestras.....	16
Cuadro 7. Preparación de soluciones hijas a partir de soluciones intermedias a partir de la muestra.....	16
Cuadro 8. Límites de detección y cuantificación para sodio, calcio y zinc por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	19
Cuadro 9. Estadísticos para la linealidad de la curva de regresión de sodio* para cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	19
Cuadro 10. Estadísticos para la linealidad de la curva de regresión de calcio* para cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	19
Cuadro 11. Estadísticos para la linealidad de la curva de regresión de zinc* para cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	19
Cuadro 12. Rango de linealidad para sodio, calcio y zinc para su cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	19
Cuadro 13. Estadísticas para la especificidad del sodio para la cuantificación en SRO marca A* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	20
Cuadro 14. Estadísticas para la especificidad del sodio para la cuantificación en SRO marca B* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	20
Cuadro 15. Estadísticas para la especificidad del calcio para la cuantificación en SRO marca A* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	20
Cuadro 16. Estadísticas para la especificidad del zinc para la cuantificación en SRO marca B* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	20
Cuadro 17. Estadísticas para la exactitud de sodio, calcio y zinc para la cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica.....	20
Cuadro 18. Estadísticas para la repetibilidad de sodio, calcio y zinc entre días a lo largo de dos semanas.....	21
Cuadro 19. Cuantificación de sodio, calcio y zinc en dos marcas de sueros para la implementación del método validado*.....	22
Cuadro 20. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de sodio para evaluación de linealidad.....	37
Cuadro 21. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de calcio para evaluación de linealidad.....	38



Cuadro 22. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de zinc para evaluación de linealidad.....	38
Cuadro 23. Coeficientes de variación para condiciones de repetibilidad ( $RSD_r\%$ ) predichos por la ecuación de Horwitz (ecuación 8) para cada analito según su concentración.....	38
Cuadro 24. Lecturas de absorbancia de las soluciones para evaluar la repetibilidad del sodio, calcio y zinc..	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de regresión de sodio para evaluar la linealidad. ....	32
Figura 2. Curva de regresión de calcio para evaluar la linealidad .....	32
Figura 3. Curva de regresión de zinc para evaluar la linealidad .....	33
Figura 4. Curva de regresión de sodio para evaluar la especificidad.....	33
Figura 5. Curva de regresión de sodio para evaluar la especificidad adicionando SRO marca A.....	34
Figura 6. Curva de regresión de sodio para evaluar la especificidad adicionando SRO marca B.....	34
Figura 7. Curva de regresión de calcio para evaluar la especificidad.....	35
Figura 8. Curva de regresión de calcio para evaluar la especificidad adicionando SRO marca A.....	35
Figura 9. Curva de regresión de zinc para evaluar la especificidad.....	36
Figura 10. Curva de regresión de zinc para evaluar la especificidad adicionando SRO marca B.....	36

## RESUMEN

Este trabajo de investigación consiste en la validación de un método analítico para la cuantificación de sodio, calcio y zinc en sueros de rehidratación oral por medio de espectrofotometría de absorción atómica con el equipo del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala. El propósito es evaluar los parámetros establecidos por la Farmacopea de Estados Unidos y el Consejo Internacional de Armonización que debe cumplir un método analítico para considerarse válido.

Para ello, se evaluó la linealidad, rango, especificidad, precisión en condiciones de repetibilidad, límite de detección y cuantificación y exactitud. Se demostró que el método cumple con todos los parámetros para la cuantificación de sodio y zinc, pero no cumple con la repetibilidad para la cuantificación de calcio.

Se busca que este trabajo se tome como base para realizar futuras validaciones para el resto de los elementos posibles de cuantificar con el espectrofotómetro de absorción atómica con el que cuenta el laboratorio donde se realizó la investigación, además de que sirva para poder mejorar y optimizar el procedimiento por medio del cual se realizó la cuantificación del sodio, calcio y zinc.

# I. INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría de absorción atómica de llama es un método analítico que permite analizar una variedad de metales. Esta técnica posee ventajas como tener sensibilidad en concentraciones alrededor de partes por millón y rapidez en los análisis, por lo que puede ser aplicada para la cuantificación de analitos en muestras desde alimentos hasta suelos. Uno de los análisis que se realiza en el Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala, donde se realiza esta investigación, es la cuantificación de sodio, calcio y zinc en sueros de rehidratación oral. Debido al potencial uso de esta técnica para la cuantificación de estos analitos, no solo en sueros de rehidratación oral sino en otras muestras, como alimentos, suelos y medicamentos, es pertinente contar con un método validado para garantizar así resultados confiables. Por lo tanto, este trabajo se enfoca en realizar una validación del método analítico para cuantificación de sodio, zinc y calcio e implementarlo en muestras de sueros de rehidratación oral.

La validación de un método es un procedimiento esencial que debe realizar un laboratorio para el análisis de muestras. Este procedimiento permite evaluar parámetros del método analítico tales como linealidad, especificidad, precisión, exactitud, rango y límites de detección y cuantificación. No realizar una validación de un método previo a implementarse en el análisis de una muestra, ya sea para investigación, educación o en la industria, trae consecuencias negativas para el laboratorio. Esto se debe a que si un método analítico no se encuentra validado no es posible garantizar la confiabilidad, seguridad y calidad de los resultados obtenidos, llevando en algunos casos incluso a reportar resultados erróneos. Dicho lo anterior, en el Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada se hacen análisis para la cuantificación de algunos metales por medio del espectrofotómetro de absorción atómica de llama. Uno de los análisis realizados en este laboratorio es la cuantificación de sodio, calcio y zinc en sueros de rehidratación oral. Es importante mencionar, que en este laboratorio no se ha llevado a cabo una validación de este método de análisis y no se conocen los parámetros anteriormente mencionados para la cuantificación de estos elementos. Por lo tanto, el presente trabajo pretende validar una metodología analítica utilizando el espectrofotómetro de absorción atómica de llama del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada para la cuantificación de sodio, zinc y calcio en sueros de rehidratación oral, la cual es una muestra con una matriz relativamente sencilla que ya se ha utilizado en el laboratorio.

## II. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Validar un método analítico para la determinación de sodio, calcio y zinc en sueros de rehidratación oral por medio del equipo de absorción atómica del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala.

### B. ESPECÍFICOS

- Evaluar las curvas de calibración de sodio, zinc y calcio para la cuantificación de dichos analitos por medio de espectrofotometría de absorción atómica de llama
- Evaluar los parámetros de especificidad, linealidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad y exactitud para determinar la validez del método analítico.
- Cuantificar el contenido de sodio, zinc y calcio en muestras de sueros orales de concentración conocida para la implementación del método analítico validado.

### III. JUSTIFICACIÓN

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica de análisis químico que hace uso de la radiación absorbida por los átomos de una muestra para determinar cuantitativamente un analito. Esta técnica permite determinar la presencia de analitos específicos y es capaz de identificar más de sesenta metales o elementos metaloides. Específicamente la espectrofotometría de absorción atómica de llama tiene límites de detección por debajo de 1 parte por millón (ppm) (Skoog et. al, 2008). Por lo tanto, esta técnica es comúnmente utilizada en la determinación de metales pesados en la muestras farmacológicas, geológicas, forenses, arqueológicas y de alimentos (Gallegos et. al, 2012; Paudel et. al, 2021; López y Rodríguez, 2018).

Por otro lado, la validación de un método consiste en un procedimiento que permite evaluar si un método analítico cumple con los requisitos establecidos por regulaciones internacionales (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito [UNODC], 2010). A lo largo del tiempo, han surgido protocolos por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América [FDA], la Farmacopea de los Estados Unidos, USP por sus siglas en inglés, la UNODC, entre otras. Que un laboratorio cumpla con la validación de los métodos analíticos que utiliza permite asegurar que los resultados obtenidos son confiables, precisos y que dicho método es reproducible (Ozkan, 2018).

Existen situaciones en las que no se realiza una validación adecuada de los métodos, debido a que no se cuenta con un protocolo adecuado para la realización de este o que las matrices a analizar pueden llegar a ser complejas (Bridwell et. al, 2011). Sin embargo, teniendo en cuenta la importancia de la validación de un método analítico y de la variedad de posibles aplicaciones de la espectrofotometría de absorción atómica de llama, en este estudio se propone la validación de un método analítico para la determinación de sodio, calcio y zinc en sueros orales haciendo uso del espectrofotómetro de absorción atómica de llama del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala. Realizar este procedimiento permitiría garantizar que el equipo anteriormente mencionado brinda resultados confiables y precisos, por lo que se crearía la posibilidad de ofrecer análisis químicos validados no solo en sueros de rehidratación oral, sino también en otro tipo de medicamentos, alimentos, muestras biológicas, entre otros (Ozkan, 2018).

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE METALES

1. Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado. La espectroscopia de emisión atómica es una técnica analítica que permite la detección de analitos en muestras inorgánicas, por lo que es usado principalmente en la detección de metales. Es posible determinar elementos con una baja susceptibilidad a interferencias químicas, además de que esta técnica tiene la capacidad de tener una buena emisión espectral para la mayoría de los elementos además de poder realizar análisis multielementales simultáneamente. Debido a los bajos niveles de detección, se utiliza para la determinación de elementos traza en muestras biológicas, arqueológicas y agrícolas (Skoog et. al, 2017; Hill, 2007).

Una característica distintiva es el uso de plasma como fuente de emisión. El plasma es un gas ionizado, es decir que contiene una alta concentración de cationes. Usualmente se utiliza argón, ya que al ser un gas noble es químicamente inerte y posee una alta energía de ionización. Además, el argón tiene la posibilidad de excitar a la mayoría de los elementos de la tabla periódica (Hill 2007; Dean, 2019). Algunas de las desventajas que presenta esta técnica es su alto costo de adquisición y mantenimiento y la presencia de diversas interferencias. Debido a el intenso fondo de la espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado, esta técnica es propensa a presentar interferencias espectrales y restricciones en los límites de detección, por lo que necesita de detectores costosos de alta resolución, como el detector de masas. Este equipo requiere de un pretratamiento de la muestra debido a que es propenso a interferencias de matriz (Hill, 2007)

#### 2. Espectroscopia de absorción atómica.

##### a. Técnica

1) Principio físico. La técnica de espectroscopia de absorción atómica se basa en el proceso de excitación del átomo. Los átomos de cada elemento poseen electrones que se encuentran dispuestos en los orbitales y cuando estos se encuentran en el de más baja energía, se dice que se encuentran en el estado basal. Dicho estado es el estado más estable energéticamente para los átomos. Sin embargo, cuando estos absorben energía, pueden pasar a un estado más inestable, llamado estado excitado. Cuando el átomo regresa a su configuración más estable, la energía absorbida se emite, siendo este el principio por el que funcionan las técnicas espectroscópicas, como la absorción, emisión y fluorescencia atómica (Beaty y Kerber, 1993).

Conociendo el concepto de absorción y emisión de energía, se puede entender el proceso por medio del cuál funciona un equipo de espectroscopia de absorción atómica. En el proceso de absorción, una fuente de luz con una intensidad inicial es enfocada hacia una celda donde se encuentran átomos en su estado basal, atomizados por una llama (Beaty y Kerber, 1993). Ya que estos átomos son capaces de absorber energía, luego

de que el haz de luz pase por la celda de la muestra, la intensidad de esta se verá disminuida. La cantidad de luz absorbida por los átomos de la muestra es información de interés, la cual puede ser medida en términos de transmitancia o absorbancia, medias que están relacionadas entre sí (Skoog et. al, 2017).

2) Métodos cuantitativos. Cuando un rayo de luz con una intensidad inicial  $I_0$  pasa a través de una muestra este interacciona con los átomos, los cuales pueden absorber cierta cantidad de energía. Por lo tanto, el rayo de luz luego de atravesar una muestra tiene una intensidad  $I$ , que es menor a la inicial. La transmitancia  $T$  es una medida que indica la radiación transmitida por el medio que atraviesa un rayo de luz (Penner, 2017; Skoog et. al, 2017).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Por otro lado, la absorbancia  $A$  es una medida que indica cuánta radiación fue absorbida por los átomos de la muestra y se encuentra escrita en términos de transmitancia. Esta medida es más útil en la espectroscopia de absorción ya que la absorbancia tiene relación directa con la concentración de la muestra (Penner, 2017; Skoog et. al, 2017).

$$A = -\log_{10}(T) = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ecuación 2})$$

La forma en la que se relaciona la absorbancia con la concentración es por medio de la ley de Beer, la cual indica que la absorbancia es directamente proporcional a la distancia  $b$  de la celda que atraviesa y una concentración  $c$ . La constante de proporcionalidad se llama absortividad  $a$  (Skoog et. al, 2017).

$$A = abc \quad (\text{Ecuación 3})$$

b. Tipos de lámpara. Como se mencionó previamente, en la espectroscopia se necesita excitar las moléculas de la muestra, por lo que se debe contar con una fuente de radiación. Actualmente, existen lámparas para cada elemento debido a que las transiciones energéticas para los átomos son únicas y se tienen líneas de absorción altamente específicas (Skoog et. al, 2017). Las lámparas utilizadas para la detección de metales son las lámparas de cátodo hueco y la de descarga sin electrodos. Sin embargo, existen las lámparas de descarga de deuterio. Estas se utilizan principalmente para correcciones de fondo, debido a que la emisión de estas disminuye conforme aumenta la longitud de onda y solo pueden utilizarse entre 190 y 320 nm (Paudel et. al, 2021).

1) Lámpara de cátodo hueco. Este tipo de lámpara es el más común. Esta cuenta con un ánodo de tungsteno y un cátodo cubierto por el metal de interés. Dentro de la lámpara, hay un gas inerte, el



cual puede ser argón o neón. Cuando los átomos del gas son ionizados por la corriente eléctrica, estos son atraídos hacia el cátodo y excitan los átomos que se encuentran en el cátodo, generando así señales en longitudes de onda características para cada elemento. Existen cátodos que contienen una mezcla de metales, por lo que una misma lámpara permite realizar la determinación de más de un solo elemento (Hill y Fisher, 2017; Skoog et. al, 2017).

2) Lámpara de descarga sin electrodos. Estas lámparas contienen una pequeña cantidad del analito, ya sea en forma de sal o en metal, en un bulbo junto a un gas inerte a una presión baja, el cual es ionizado y excita el analito para así obtener el espectro característico. Al no tener electrodo, estas lámparas son excitadas por microondas o radiofrecuencia, por lo que tienen una energía radiante más intensa que las lámparas de cátodo hueco. Estas lámparas son menos frecuentes que las de cátodo hueco. Sin embargo, presentan un mejor límite de detección para metales como selenio, arsénico y antimonio, ya que tienen mayor sensibilidad y precisión (Hill y Fisher, 2017; Paudel et. al, 2021; Skoog et. al, 2017).

a. Atomización de llama. Al tener una solución de la muestra esta es desolvatada, es decir, el solvente es evaporado y se produce un aerosol con partículas finas. Este aerosol es volatilizado para obtener un gas, en el cual se ionizan los átomos para obtener cationes y electrones. Este proceso se conoce como atomización de llama, para lo cual se tiene un gas oxidante y un gas combustible (Skoog et. al, 2017).

Los gases oxidantes en espectroscopia de absorción atómica de llama son el aire, oxígeno y óxido nítrico; los combustibles son hidrógeno, acetileno y gas natural. El tipo de gas utilizado afecta la efectividad de la atomización de la muestra. Al utilizar aire como gas oxidante, se obtienen temperaturas desde 1700°C hasta 2400°C y por ello solo muestras que son sencillas de descomponer se atomizan correctamente. Sin embargo, si se utiliza óxido nítrico se producen temperaturas de 2500°C hasta 3100°C, lo cual hace posible atomizar de mejor manera las muestras. Por lo que, tanto el flujo del gas oxidante como el del combustible son variables importantes para optimizar un análisis. Además, es importante señalar que experimentalmente se ha determinado que para metales que forman óxidos estables es recomendable utilizar un exceso de gas combustible para mejorar la atomización (Skoog et. al, 2017).

b. Interferencias. Las interferencias son errores que pueden afectar las lecturas de absorbancia de las muestras, y por lo tanto la concentración. Existen seis tipos de interferencias: química, espectral, de ionización, de matriz, de emisión y la absorción de fondo.

Las interferencias químicas son causadas por procesos en la atomización que pueden alterar al analito y su absorción (Skoog et. al, 2017). Estas pueden ser evitadas utilizando altas temperaturas en la llama o añadiendo un agente más reactivo junto con la muestra o estándar para que este reaccione con el interferente en la muestra (Skoog et. al, 2017; Perkin Elmer Corporation, 1996). Las interferencias de ionización son aquellas

que suceden al tener una temperatura suficientemente energética para remover un átomo, reduciendo así la absorción. Esto se puede corregir añadiendo un exceso de un elemento fácilmente ionizable en el blanco, estándar y muestras. De esta manera, se evita la ionización del analito y no se afecta su absorbancia (Perkin Elmer Corporation, 1996).

Si se tienen muestras y estándares con propiedades físicas diferentes, como la viscosidad y características de combustión, se generan interferencias de matriz. Esto sucede usualmente al tener a las muestras a temperaturas diferentes o cuando una solución contiene altas concentraciones de ácidos o sales. Para evitar estas interferencias es recomendable procurar que la matriz de las muestras, blanco y estándares sean similares, por ejemplo, utilizando los mismos solventes. Otra forma de evitar esta interferencia es haciendo uso del método de adición de estándares (Perkin Elmer Corporation, 1996). Otro problema común se da cuando las partículas de la matriz de la muestra o estándares causan señales de absorción. Esta se conoce como interferencia de fondo, y a diferencia de la interferencia de matriz, esta no puede ser corregida por medio del método de adición de estándares. Para evitar los errores causados por estas interferencias, se lee la absorción de fondo y esta señal se resta a la obtenida en los estándares y muestra, para así obtener únicamente la absorción debida al analito de interés (Perkin Elmer Corporation, 1996).

Cuando las líneas de emisión del analito se superponen con las de otra especie en la muestra se tiene una interferencia espectral. Esto hace que se obtenga un error positivo ya que no se está detectando únicamente la señal del analito, sino también la de la especie interferente. Este error se puede evitar utilizando una línea espectral del analito que se encuentre más alejada de la especie interferente (Perkin Elmer Corporation, 1996). Por último, se debe considerar que al tener un analito con intensidad de emisión alta, se reduce la absorción debido a que hay pocos átomos en estado basal, causando interferencias de emisión. Estas pueden ser corregidas utilizando temperaturas bajas de la llama o aumentando la corriente de la lámpara (Farrukh, 2012; Perkin Elmer Corporation, 1996).

Para el sodio y calcio se suelen tener interferencias de ionización que se pueden corregir utilizando una sal alcalina al 0.1%, se recomienda utilizar cloruro de potasio o cesio. En el caso del sodio, su señal se ve reducida en presencia de ácidos minerales. Además, es importante tener en cuenta que en presencia de elementos propensos a formar oxisales, la sensibilidad del calcio se reduce. Esto se puede corregir añadiendo entre 0.1% y 1% de estroncio o lantano. El zinc no presenta interferencias (Perkin Elmer Corporation, 1996).

## B. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Según la norma ISO 9001:2015, la validación es la confirmación de que un método analítico ha cumplido con los requisitos para utilizarse en la determinación de un analito de interés. Esto se establece mediante estudios de laboratorio, determinando ciertos parámetros (Organización Internacional para la Estandarización, 2017). Según la norma COGUANOR NTG /ISO/IEC 17025, las características de desempeño que se deben

determinar son el rango de medición, exactitud, incertidumbre de medición de los resultados o precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad del método o especificidad, linealidad, repetibilidad o reproducibilidad y la robustez del método (Comisión Guatemalteca de Normas, 2017).

La importancia de una validación radica en que permite probar que el método analítico utilizado brinda resultados confiables. Es un proceso necesario de realizar sobre todo en la industria de fabricación de medicamentos, ya que permite caracterizarlos y asegurar que los resultados reportados son exactos y precisos. También es de importancia realizar la verificación del método, lo cual se realiza con mayor frecuencia sobre una metodología previamente validada. Esta sirve para demostrar que el método funciona al ejecutarse por primera vez utilizando personal, equipo y reactivos disponibles (Bridwell et. al, 2011).

1. **Precisión.** La precisión es un indicador de la proximidad de los resultados obtenidos, a partir de un método analítico, entre sí. Para ello se mide la dispersión de una serie de medidas obtenidas a partir de múltiples lecturas de una muestra homogénea con las mismas condiciones. Este parámetro se puede evaluar en tres niveles: reproducibilidad, repetibilidad y precisión inmediata (Bridwell et. al, 2011).

La reproducibilidad se refiere a la capacidad de un procedimiento analítico de ser usado en distintos laboratorios. La repetibilidad indica la precisión de un método utilizado bajo las mismas condiciones, tales como el mismo equipo y analista durante un período corto de tiempo. Por último, la precisión inmediata o robustez, indica la variación dentro de un mismo laboratorio en diferentes días con distintos analistas (Slezák, 2011; Farmacopea de Estados Unidos, 2021).

2. **Exactitud.** La exactitud es una medida de la proximidad de los resultados obtenidos a partir de un método analítico con un valor verdadero o de referencia (Farmacopea de Estados Unidos, 2021). Según el Consejo Internacional de Armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano [ICH] se recomienda evaluar la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado, es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración (Borman y Elder, 2017)

3. **Especificidad.** Se define especificidad como la capacidad de poder evaluar un analito en presencia de otras especies y poder asegurar que las señales son debidas al átomo o molécula de interés. Algunas de las especies que se pueden encontrar en la matriz son las impurezas, solventes y productos de degradación (Bridwell et. al, 2011).

4. **Límite de detección.** El límite de detección, LOD por sus siglas en inglés, indica la concentración mínima que puede ser detectada pero no cuantificada. Esta se puede calcular con la siguiente expresión

$$\text{LOD} = \frac{k\sigma_{\{\text{blanco}\}}}{m} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde k es una constante, usualmente se utiliza 3 o 3.3,  $\sigma_{\{\text{blanco}\}}$  es la desviación estándar de 20 medidas del blanco y m es la pendiente obtenida en la curva de calibración (Armbruster y Pry, 2008).

5. **Límite de cuantificación.** El límite de cuantificación, LOQ por sus siglas en inglés, indica la concentración mínima cuantificable. Esta se calcula utilizando la siguiente expresión

$$\text{LOD} = \frac{10 \times \sigma_{\{\text{blanco}\}}}{m} \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde  $\sigma_{\{\text{blanco}\}}$  es la desviación estándar de 20 medidas del blanco y m es la pendiente obtenida en la curva de calibración (Armbruster y Pry, 2008).

6. **Linealidad.** La linealidad es el parámetro que asegura que la concentración de un analito de interés es directamente proporcional a la medida de lectura del equipo, tal como la absorbancia o área cromatográfica. Este parámetro debe cumplirse en el rango de medición, lo cual asegura que en este intervalo se cumple con la ley de Beer (Farmacopea de Estados Unidos, 2021).

7. **Rango de medición.** El rango de medición indica el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito en una muestra para las cuales el método analítico cumple con brindar resultados precisos, exactos y que cumplen con linealidad. El intervalo se reporta en las mismas unidades que la cantidad de analito reportado (Bridwell et. al, 2011).

## C. SUEROS DE REHIDRATACIÓN ORAL

La deshidratación es un cuadro clínico común en niños, el cual se caracteriza por un balance negativo de agua y electrolitos en el organismo. Las principales causas son la pérdida de agua, debido a gastroenteritis aguda y vómitos, o disminución de la ingestión de esta (Molina Cabañero, 2019). El tratamiento recomendado para pacientes con deshidratación leve y moderada es la terapia de rehidratación oral. Esta consiste en administrar soluciones de rehidratación oral, también conocidos como sueros de rehidratación oral (SRO), para restablecer el equilibrio de electrolitos en el organismo. Esta terapia fue desarrollada por la Organización Mundial de la Salud [OMS] en 1977, como una solución sencilla de administrar, de bajo costo, con una medida de éxito del

90% al 95% y que puede ser aplicable tanto a niños como adultos (Molina Cabañero, 2019; de Materán et. al, 2009).

1. **Importancia de los electrolitos en el cuerpo humano.** Al sufrir deshidratación, los niveles electrolitos se ven alterados en el cuerpo humano. Los que se encuentran en mayor abundancia son el sodio, potasio, calcio, cloruro y magnesio, siendo los primeros dos elementos químicos indispensables para los seres vivos. El sodio tiene la función de regulación del equilibrio ácido base en los tejidos, participación en la absorción de glucosa, y conjuntamente con el potasio realiza el transporte de otros nutrientes a través de la membrana celular, regulando así la presión osmótica de las células. Otras funciones del potasio son la síntesis de proteínas y glucógeno, conducción de impulsos nerviosos, contracciones musculares y el mantenimiento del ritmo cardíaco (Pérez-López y Esquivel-Arias, 2018). La disminución de calcio afecta de igual manera el funcionamiento celular, la estabilidad de la membrana celular y el procesamiento de señales intracelulares (Mahmoud et. al, 2019).

2. **Composición química de los sueros de rehidratación oral.** Por lo tanto, los sueros de rehidratación están compuestos comúnmente de sodio, potasio y calcio en forma de cloruros, agua, glucosa y una base, la cual puede ser bicarbonato, citrato sódico o acetato. En menores cantidades, algunos sueros cuentan con calcio, magnesio, fósforo, cobre y zinc. La administración de suplementos de zinc a los SRO ha sido uno de los avances recientes en este tipo de terapia. La función de este suplemento es disminuir el volumen y frecuencia de las evacuaciones debido a la gastroenteritis o diarrea, previniendo que se agrave la enfermedad. Además, este suplemento evita recaer en una deshidratación en los próximos 2 meses y mejora el apetito (de Materán et. al, 2009; (Pérez-López y Esquivel-Arias, 2018).

## V. MARCO METODOLÓGICO

### A. MATERIALES

#### 1. Equipo y cristalería

- Balones aforados de 100 mL
- Balones aforados de 25 mL
- Balón aforado de 250 mL
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro Perkin Elmer PinAAcle 900 F con software WinLab 32 AA Versión 7.3 con llama de aire/acetileno
- Micropipeta de 5 a 1000  $\mu$ L
- Micropipeta de 0.5 a 5 mL

#### 2. Reactivos

- Estándar de calcio 1003 ppm 4%  $\text{HNO}_3$
- Estándar de zinc al 998 ppm 4%  $\text{HNO}_3$
- Cloruro de potasio, pureza 99.5%
- Cloruro de sodio, pureza 99.5%
- Agua destilada
- Ácido nítrico al 65%

### B. POBLACIÓN Y MUESTRA

1. Población. Se evalúa el contenido de zinc, calcio y sodio en sueros de rehidratación oral comercializados en Guatemala.

2. Muestra. La muestra utilizada son dos marcas diferentes (A y B) de sueros de rehidratación oral de dos lotes diferentes.

## C. VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

### 1. Variables independientes.

- Concentración de sodio, zinc y calcio en sueros de rehidratación oral.
- Lotes de sueros de rehidratación oral
- Días de análisis

### 2. Variables dependientes.

- Absorbancia de sodio, zinc y calcio en sueros de rehidratación oral.

## D. ALCANCES Y LIMITACIONES

1. **Alcance.** En este estudio se evalúa el contenido de sodio, zinc y calcio en sueros de rehidratación oral de dos marcas diferentes, ya que una contiene sodio y calcio y la otra sodio y zinc. Para los analitos de interés se evalúan los parámetros de exactitud, especificidad, repetibilidad, linealidad, rango y límite de detección y cuantificación para poder validar el método analítico para cuantificación de estos elementos por medio de espectrofotometría de absorción atómica de llama e implementar el método validado en muestras de sueros orales.

2. **Limitaciones.** Los resultados serán validados únicamente para los sueros de rehidratación oral de dos marcas. A partir de estos resultados, se puede notar la necesidad de realizar una validación de un método no solo para los analitos de interés en esta investigación, sino para los otros analitos que se pueden analizar en el Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada según las lámparas que se tienen disponibles.

## E. DISEÑO EXPERIMENTAL

Es importante notar que las micropipetas utilizadas deben ser verificadas y toda la cristalería utilizada debe ser limpiada según el procedimiento descrito en los incisos E y F en Anexos, respectivamente.

1. **Validación del método.** Para realizar la validación de la metodología se evalúa la linealidad, exactitud, repetibilidad, límite de detección y cuantificación, especificidad y rango, según los procedimientos sugeridos por el Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano, ICH por sus siglas en inglés.

a. Linealidad y rango. Siguiendo la recomendación de la ICH de utilizar al menos cinco puntos para evaluar la linealidad (Farmacopea de los Estados Unidos [USP], 2021), se describe a continuación la preparación de seis soluciones estándar de cada analito de interés.

1) Preparación de soluciones intermedias. Se utilizó como referencia la concentración para las soluciones madres de cada analito en el procedimiento descrito por Perkin Elmer en el manual Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy (1996). Estas se preparan con las cantidades de reactivo que se indican en el Cuadro 1.

Las soluciones madre se preparan en balones aforados de 100 mL y se aforan con agua destilada.

Cuadro 1. Reactivos para la preparación de soluciones madre para cada analito

Analito	Concentración (ppm)	Reactivo	Cantidad de reactivo añadida
Calcio	500	Estándar de Ca 1003 ppm	49.85 mL
Sodio	1000	Cloruro de sodio, pureza 99.5 %	0.2554 g
Zinc	500	Estándar de Zn 998 ppm	50.1 mL

A partir de las soluciones madre, se prepararon soluciones hijas que se utilizarán para preparar las soluciones para la curva de calibración como se indica en el Cuadro 2. Las soluciones hijas se preparan en balones aforados de 100 mL y se aforan con agua destilada.

Cuadro 2. Preparación de soluciones hijas de cada analito.

Analito	Concentración de solución madre (ppm)	Concentración de solución hija deseada (ppm)	Cantidad de solución madre añadida (mL)
Calcio	500	100	20
Sodio	1000	100	10
		50	5
Zinc	500	100	20
		50	10

2) Preparación de estándares. Se utilizó como referencia para los rangos de concentración de los estándares de cada elemento el procedimiento descrito por Perkin Elmer en el manual Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy (1996). Las soluciones para la curva de calibración (llamadas estándares) se preparan a partir de las soluciones hijas obtenidas con las indicaciones del Cuadro 2.

Todas las soluciones se preparan en balones aforados de 100 mL, con las cantidades indicadas en el Cuadro 3 y son aforadas con agua destilada.



Cuadro 3. Preparación de los estándares de cada analito

Analito	Aditivo*	Concentración de estándares (ppm)	Concentración de solución añadida (ppm)	Volumen de solución añadida (µL)
Calcio	0.1 g de KCl	0.75	500	150
		1.50	500	300
		2.25	500	450
		3.00	500	600
		3.75	500	750
		4.50	500	900
Sodio	0.1 g de KCl	0.15	100	150
		0.30	100	300
		0.45	100	450
		0.60	100	600
		0.75	100	750
		0.90	100	900
Zinc	No aplica	0.15	100	150
		0.30	100	300
		0.45	100	450
		0.60	100	600
		0.75	100	750
		0.90	100	900

\*Se añade este aditivo para evitar interferencias por ionización en los estándares

3) Lectura de estándares. Para las longitudes de onda en las que se leen los estándares de cada analito se utilizó como referencia el procedimiento descrito por Perkin Elmer en el manual Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy (1996), las cuales se encuentran indicadas en el Cuadro 4. Se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer PinAAcle 900F siguiendo el procedimiento estándar de operación que se encuentra en Anexos, inciso C.

Cuadro 4. Condiciones para la lectura de analitos en los estándares

Elemento	Longitud de onda (nm)
Calcio	422.7
Sodio	589.0
Zinc	231.9

b. Exactitud y precisión. Para evaluar este parámetro, se determinó la concentración de soluciones preparadas con los estándares de cada analito utilizando la curva de calibración respectiva.

Siguiendo las recomendaciones de la ICH, se utilizaron 3 concentraciones para evaluar la exactitud para cada analito y cada solución se debe preparar en triplicado (Farmacopea de los Estados Unidos [USP], 2021).

Para evaluar precisión en condiciones de repetibilidad, tres días por semana durante dos semanas se repite este procedimiento por el mismo analista utilizando los mismos reactivos y equipo. Las soluciones se preparan tomando las alícuotas de las soluciones hijas indicadas en el Cuadro 5. Todas las soluciones se preparan en balones aforados de 100 mL y se aforan con agua destilada.

Cuadro 5. Preparación de soluciones para evaluar la exactitud

Elemento	Aditivo*	Concentración de estándares (ppm)	Concentración de solución añadida (ppm)	Volumen de solución añadida (µL)
Calcio	0.1 g de KCl	1.00	100	200
		2.50	100	500
		3.50	100	700
Sodio	0.1 g de KCl	0.25	50	25
		0.50	50	50
		0.70	50	70
Zinc	No aplica	0.25	50	50
		0.50	50	100
		0.70	50	140

\*Se añade este aditivo para evitar interferencias por ionización en los estándares

c. Límite de detección y cuantificación. Siguiendo las recomendaciones de la ICH, se obtienen lecturas de los blancos de los estándares en triplicado, el cual para todos los analitos es agua destilada (Farmacopea de los Estados Unidos [USP], 2021).

d. Especificidad. Para evaluar este parámetro se busca realizar dos curvas de calibración para cada analito donde a una de ellas se le agrega 1 mL de la muestra a cada solución estándar, para evaluar si existe interferencia de la matriz en los resultados de la curva de calibración (Rodríguez – Rodríguez et. al, 2004).

Las soluciones de las curvas de calibración se preparan con el procedimiento indicado en el inciso 1.a de esta sección. Se preparan soluciones para dos curvas de calibración de sodio, una de zinc y una de calcio. Antes de aforar, se agrega 1 mL de SRO marca A a las soluciones estándar de una de las curvas de sodio y calcio. De manera similar, se agrega 1 mL de SRO marca B a las soluciones estándar de la curva de sodio restante y a la de zinc.

2. Implementación del método. Se utilizan dos lotes diferentes de dos marcas de sueros de rehidratación oral para evaluar los analitos de interés. El procedimiento se repite tres días a la semana, durante una semana. Cada semana se utiliza un lote diferente de cada suero.

a. Preparación de soluciones intermedias. Se preparan las soluciones madres para la preparación de las muestras tomando las cantidades de muestra indicadas en el Cuadro 6 para el sodio.

Cuadro 6. Preparación de soluciones intermedias a partir de las muestras

Analito	Marca de SRO	Concentración deseada (ppm)	Volumen de muestra añadida (mL)
Sodio	A	50 ppm	7.231
	B	50 ppm	7.226

Se obtiene el volumen a agregar para cada marca de suero teniendo en cuenta que el contenido reportado en el SRO marca A es de 432.13 mg en 625 mL y en el SRO marca B es de 345.98 mg en 500 mL.

b. Preparación de muestras. Se preparan las muestras con las cantidades indicadas en el Cuadro 7, de tal manera que estas se encuentren dentro del rango de la curva de calibración correspondiente a cada analito. Todas las muestras se aforan a 100 mL y se preparan en triplicado. Al sodio y calcio se le añade 0.1 g de KCl, como aditivo para evitar interferencias por ionización.

Cuadro 7. Preparación de soluciones hijas a partir de soluciones intermedias a partir de la muestra

Analito	Marca de SRO	Concentración deseada (ppm)	Concentración de solución añadida (ppm)	Volumen de solución añadida (mL)
Calcio	A	3.5	81.78*	4.28
Sodio	A	0.5	50	1
	B			
Zinc	B	0.5	8.61*	5.81

\*Para el zinc y el calcio no se utilizan soluciones intermedias, como en el caso del sodio, por lo que la concentración de la solución a agregar es la concentración de los analitos según lo reportado por los fabricantes de cada marca.

c. Lectura de muestras. Para las longitudes de onda en las que se leen los estándares de cada analito se utilizó como referencia el procedimiento descrito por Perkin Elmer en el manual *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy* (1996), las cuales se indican en el Cuadro 3. Se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer PinAAcle 900F siguiendo el procedimiento estándar de operación que se encuentra en Anexos, inciso C.

## F. PROPUESTA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. **Linealidad y rango.** Se evalúa la adecuación del modelo de regresión lineal para describir la relación entre la concentración de sodio, calcio y zinc con las lecturas de absorbancia obtenidas por medio de espectroscopia de absorción atómica, indicando que se cumple la ley de Beer dentro del rango trabajado para cada analito.

- Obtener una ecuación ajustada por medio de una regresión lineal.
- Determinar el mejor ajuste del modelo haciendo uso del coeficiente de determinación  $R^2$  y la correlación de las variables haciendo uso del coeficiente de correlación de Pearson R.
- Probar si hay una relación significativa entre la concentración de sodio, calcio y zinc con las lecturas de absorbancia, realizando una prueba t.

2. **Exactitud.** Siguiendo la recomendación de la ICH, se evalúa que los niveles de concentración que se prepararon según el inciso 1.b tengan un porcentaje de recuperación que se encuentre entre 80% y 120% (Farmacopea de los Estados Unidos [USP], 2021).

- Determinar la concentración real de las soluciones utilizando la curva de calibración correspondiente para cada analito.
- Obtener el porcentaje de error (%E) utilizando la ecuación 6.
- Obtener el porcentaje de recuperación utilizando la ecuación 7.

$$\%E = \frac{|\text{valor observado} - \text{valor real}|}{\text{valor real}} \times 100 \text{ (Ecuación 6)}$$

$$\%R = \frac{\text{valor obtenido}}{\text{valor esperado}} \times 100 \text{ (Ecuación 7)}$$

3. **Precisión en condiciones de repetibilidad.** Siguiendo la recomendación de la ICH, se utiliza el coeficiente de variación para evaluar este parámetro. Para ello, se utilizará como criterio el coeficiente de variación predicho por la ecuación de Horwitz. La ecuación de Horwitz expone que el comportamiento de la dispersión de los datos se puede predecirse con una gráfica, llamada la trompeta de Horwitz, la cual se puede ver en la Figura 11 en la sección de anexos. La trompeta de Horwitz consiste en un gráfico del coeficiente de variación según la concentración (Orozco y Báez, 2010).

- Obtener el coeficiente de variación (%RSD) provisto por el software WinLab 32 AA Versión 7.3, para la lectura de cada solución preparada en el inciso 1.b.

- Obtener el coeficiente de variación predicho por la ecuación de Horwitz (ecuación 8) y comparar que el RSD% experimental se encuentre por debajo del PRSD<sub>r</sub> (Orozco y Báez, 2010).

$$PRSD_r = 0.5 * 2^{(1-0.5 \log_{10} C)} \text{ (Ecuación 8)}$$

Donde PRSD<sub>r</sub> = coeficiente de variación predicho y C = concentración de la cual se quiere calcular el RSD% expresada en %(g/g)

4. **Límite de detección.** Se determina el límite de detección para cada curva de calibración utilizando las lecturas de los blancos, que para los tres analitos es agua destilada. Se utiliza una de las opciones recomendadas por la ICH, la cual se basa en la desviación estándar de la respuesta del blanco (Farmacopea de los Estados Unidos [USP], 2021). Para ello, calcular el límite de detección (LD) utilizando la ecuación 2.

$$LD = 3.3 \frac{\sigma}{m} \text{ (Ecuación 8)}$$

donde s = desviación estándar de la respuesta del blanco y m = pendiente de la curva de calibración.

5. **Límite de cuantificación.** Se determina el límite de cuantificación para cada curva de calibración utilizando las lecturas de los blancos, que para los tres analitos es agua destilada. Se utiliza una de las opciones recomendadas por la ICH, la cual se basa en la desviación estándar de la respuesta del blanco (Farmacopea de los Estados Unidos [USP], 2021). Para ello, calcular el límite de cuantificación (LD) utilizando la ecuación 3.

$$LC = 10 \frac{\sigma}{m} \text{ (Ecuación 9)}$$

donde s = desviación estándar de la respuesta del blanco y m = pendiente de la curva de calibración.

6. **Especificidad.** Se busca evaluar si las dos curvas de calibración obtenidas para cada analito según el inciso 1.d. de esta sección sean estadísticamente iguales, lo cual indicaría que no hay interferencia por la matriz de las muestras.

- Realizar una prueba F de Fisher para determinar que las varianzas tanto de la pendiente como del intercepto de las dos curvas de calibración correspondientes a cada analito.
- Realizar una prueba t de Student para determinar si existe diferencia entre la pendiente de las dos curvas correspondientes a cada analito

## VI. RESULTADOS

Cuadro 8. Límites de detección y cuantificación para sodio, calcio y zinc por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

Elemento	Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
Sodio	0.1012	0.3068
Calcio	0.2881	0.8731
Zinc	0.0819	0.2481

Cuadro 9. Estadísticos para la linealidad de la curva de regresión de sodio\* para cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica

Pendiente	Intercepto	Coefficiente de determinación	Coefficiente de correlación	Valor p
$0.8102 \pm 0.0241$	$0.0291 \pm 0.0131$	0.9956	0.9978	$4.42 \times 10^{-7}$

\*La curva de regresión de sodio se muestra en la Figura 1 en anexos.

Cuadro 10. Estadísticos para la linealidad de la curva de regresión de calcio\* para cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica

Pendiente	Intercepto	Coefficiente de determinación	Coefficiente de correlación	Valor p
$0.01426 \pm 0.0004$	$0.0080 \pm 0.0011$	0.9973	0.9987	$2.62 \times 10^{-6}$

\*La curva de regresión de calcio se muestra en la Figura 2 en anexos.

Cuadro 11. Estadísticos para la linealidad de la curva de regresión de zinc\* para cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica

Pendiente	Intercepto	Coefficiente de determinación	Coefficiente de correlación	Valor p
$0.4205 \pm 0.0096$	$0.0074 \pm 0.0052$	0.9974	0.9987	$1.14 \times 10^{-7}$

\*La curva de regresión de zinc se muestra en la Figura 3 en anexos

Cuadro 12. Rango de linealidad para sodio, calcio y zinc para su cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

Elemento	Rango
Sodio	0.15 – 0.90
Calcio	0.75 – 4.50
Zinc	0.15 – 0.90

Cuadro 13. Estadísticas para la especificidad del sodio para la cuantificación en SRO marca A\* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

	Curva de calibración sin muestra	Curva de calibración con SRO marca A	F calculado	F teórico	t calculado	t teórico
Pendiente	0.8107 ± 0.0345	0.7550 ± 0.0365	0.891	6.390	1.111	2.896

\*Las curvas de regresión de sodio utilizadas para estas estadísticas se muestran en la Figura 4 y 5 en anexos.

Cuadro 14. Estadísticas para la especificidad del sodio para la cuantificación en SRO marca B\* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

	Curva de calibración sin muestra	Curva de calibración con SRO marca B	F calculado	F teórico	t calculado	t teórico
Pendiente	0.8107 ± 0.0345	0.7688 ± 0.0392	0.775	6.390	0.804	2.896

\*Las curvas de regresión de sodio utilizadas para estas estadísticas se muestran en la Figura 4 y 6 en anexos.

Cuadro 15. Estadísticas para la especificidad del calcio para la cuantificación en SRO marca A\* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

	Curva de calibración sin muestra	Curva de calibración con SRO marca A	F calculado	F teórico	t calculado	t teórico
Pendiente	0.0166 ± 0.0007	0.0152 ± 0.0006	1.278	6.390	1.519	2.896

\*Las curvas de regresión de calcio utilizadas para estas estadísticas se muestran en la Figura 7 y 8 en anexos.

Cuadro 16. Estadísticas para la especificidad del zinc para la cuantificación en SRO marca B\* por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

	Curva de calibración sin muestra	Curva de calibración con SRO marca B	F calculado	F teórico	t calculado	t teórico
Pendiente	0.4453 ± 0.0095	0.4252 ± 0.0128	0.549	6.390	1.256	2.896

\*Las curvas de regresión de zinc utilizadas para estas estadísticas se muestran en la Figura 9 y 10 en anexos.

Cuadro 17. Estadísticas para la exactitud de sodio, calcio y zinc para la cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica

Elemento	Muestra	Concentración experimental (ppm)	Concentración teórica (ppm)	Error (%)	Recuperación (R%)
Sodio	1	0.2998 ± 0.0266	0.25	19.91	119.91
	2	0.5526 ± 0.0442	0.5	10.52	110.52
	3	0.7017 ± 0.0207	0.7	0.25	100.25
Calcio	1	1.1682 ± 0.0316	1	16.82	116.82
	2	2.4500 ± 0.0113	2.5	2.00	98.00
	3	3.3350 ± 0.0423	3.5	4.71	95.29

Elemento	Muestra	Concentración experimental (ppm)	Concentración teórica (ppm)	Error (%)	Recuperación (R%)
Zinc	1	0.2585 ± 0.0047	0.25	3.42	103.42
	2	0.5199 ± 0.0060	0.5	3.99	103.99
	3	0.6981 ± 0.0228	0.7	0.27	99.73

Cuadro 18. Estadísticas para la repetibilidad de sodio, calcio y zinc entre días a lo largo de dos semanas

Elemento	Semana	Muestra	Concentración experimental (ppm)	Coefficiente de variación (%)	Cumple/No cumple*
Sodio	1	1	0.3289 ± 0.0102	3.09	Cumple
		2	0.6026 ± 0.0224	3.71	Cumple
		3	0.6843 ± 0.0288	4.21	Cumple
	2	1	0.2937 ± 0.0056	1.91	Cumple
		2	0.5190 ± 0.0021	0.40	Cumple
		3	0.6962 ± 0.0045	0.65	Cumple
	3	1	0.2767 ± 0.0242	8.75	Cumple
		2	0.5362 ± 0.0099	1.85	Cumple
		3	0.7247 ± 0.0265	3.65	Cumple
Calcio	1	1	1.1924 ± 0.2183	18.30	No cumple
		2	2.4369 ± 0.1111	4.56	Cumple
		3	3.3842 ± 0.0643	1.90	Cumple
	2	1	1.1324 ± 0.1255	11.07	No cumple
		2	2.1882 ± 0.1838	8.40	No cumple
		3	3.3165 ± 0.2344	7.07	No cumple
	3	1	1.1368 ± 0.0657	5.78	Cumple
		2	2.1378 ± 0.0117	0.55	Cumple
		3	2.9768 ± 0.0523	1.76	Cumple
Zinc	1	1	0.2589 ± 0.0093	3.61	Cumple
		2	0.5148 ± 0.0064	1.24	Cumple
		3	0.7013 ± 0.0051	0.72	Cumple
	2	1	0.2631 ± 0.0045	1.70	Cumple
		2	0.5265 ± 0.0046	0.87	Cumple
		3	0.7192 ± 0.0019	0.26	Cumple
	3	1	0.2536 ± 0.0020	0.80	Cumple
		2	0.5185 ± 0.0017	0.33	Cumple
		3	0.6739 ± 0.0025	0.37	Cumple



\*Se determina si un resultado cumple o no cumple comparándolo con el coeficiente de variación predicho para cada concentración según la ecuación de Horwitz (ecuación 8), los cuales se encuentran en el cuadro 22 en anexos.

Cuadro 19. Cuantificación de sodio, calcio y zinc en dos marcas de sueros para la implementación del método validado\*

Marca de SRO	Elemento	Contenido en mg	Error (%)	Recuperación (%)
A*	Sodio	427.62 ± 8.58	5.95	106.99
	Calcio	63.23 ± 3.98	23.71	123.11
B**	Sodio	713.10 ± 8.89	10.07	111.54
	Zinc	4.34 ± 0.01	0.76	100.63

\*El contenido reportado corresponde a 650 mL de SRO

\*\* El contenido reportado corresponde a 500 mL de SRO

## VII. DISCUSIÓN

El propósito principal de la presente investigación fue realizar la validación de un método analítico para la determinación de sodio, calcio y zinc utilizando el equipo de absorción atómica del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala en sueros de rehidratación oral (SRO). Para ello, se evalúa la repetibilidad, exactitud, linealidad, rango con estándares para cada elemento. En el caso de la especificidad, esta se evalúa con estándares para cada elemento y con las muestras que se utilizan para la implementación del método validado, con el fin de comprobar que el resto de los componentes de la matriz de estas no interfiere en la cuantificación del analito. Para implementar el método validado se busca cuantificar el contenido de sodio y calcio en el SRO marca A y el contenido de sodio y zinc en el SRO marca B.

### A. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para cada uno de los tres analitos que se busca cuantificar se encontró tanto el límite de detección y cuantificación haciendo 9 lecturas del blanco en total, de las cuales se obtuvo un promedio con el cual se utilizó la ecuación 8 y 9, respectivamente. Para el sodio y el zinc se puede observar en el Cuadro 8 de la sección de resultados que se obtuvieron límites de detección y cuantificación que se encuentran por debajo de la concentración más baja utilizada para realizar las curvas de calibración y las pruebas de exactitud y repetibilidad.

Sin embargo, para el caso del calcio, si bien el límite de detección se encuentra por debajo de la concentración más baja utilizada para la revisión de estos parámetros, el límite de cuantificación se encuentra por encima de esta. Esto indica que para el calcio se puede atribuir poca confiabilidad para la cuantificación de soluciones a una concentración que se encuentre por debajo de 0.8731 ppm, dato que se presenta también en el Cuadro 8 de la sección de resultados.

### B. LINEALIDAD Y RANGO

Para evaluar la linealidad de cada analito se utilizó el coeficiente de determinación, de correlación y la prueba t. El coeficiente de determinación indica qué tan bien se ajusta el modelo para explicar la relación entre las variables; el de correlación, qué tan relacionadas están las variables. La prueba t indica si hay una relación lineal significativa entre la concentración con la absorbancia obtenida. Para esto se utilizó un nivel de confianza de 95%, es decir  $\alpha = 0.05$ .

Comenzando con la prueba t, poder decir que hay una relación lineal significativa entre las variables el valor p de la variable dependiente debe ser menor a  $\alpha$ . Como se puede observar en el Cuadro 9, 10 y 11, tanto

el sodio, calcio y zinc tienen valores  $p$  menores a  $\alpha = 0.05$ . Por lo tanto, se puede concluir que para los tres analitos hay una relación lineal significativa entre la concentración y la absorbancia.

Respecto al coeficiente de determinación y de correlación, se establece que se consideran valores aceptables aquellos que son superiores a 0.99. Para el sodio y el zinc, incluyendo la lectura del blanco dentro de la curva, se obtuvieron coeficientes de determinación de 0.9956 y 0.9974 y de correlación de 0.9978 y 0.9987, respectivamente. Por lo tanto, se puede decir que para estos elementos se tiene una buena adecuación al modelo de regresión lineal y una buena relación entre las variables al trabajar dentro del rango de 0 - 0.9 ppm. Para el calcio, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9973 y uno de correlación de 0.9987, sin incluir al blanco dentro de la curva de calibración. Por lo tanto, el rango en el que se tiene una buena adecuación del modelo y una buena relación entre las variables es de 0.75 – 4.50 ppm.

### C. EXACTITUD

Para evaluar este parámetro se utilizaron dos estadísticos: el porcentaje de recuperación y el error relativo porcentual. El porcentaje de recuperación (%R) indica la capacidad del método para cuantificar un analito y se consideran valores aceptables aquellos que se encuentren entre 80% y 120%. El error relativo porcentual indica que tanto se ajusta el valor experimental con el valor teórico. Siguiendo las recomendaciones de la ICH, se determinó la exactitud en tres niveles de concentración diferentes, cada uno realizado en triplicado, dentro del rango de linealidad de cada analito, como se puede observar en el Cuadro 17 de la sección de resultados.

Para el sodio, calcio y zinc, se obtuvieron valores para el error relativo no mayores a 20%, por lo que se considera que el valor experimental se encuentra cercano al valor teórico indicando que no hay un mayor error en los resultados obtenidos. Además, para los tres analitos evaluados en los tres niveles de concentración se obtiene que los porcentajes de recuperación se encuentran dentro del rango aceptable de 80 – 120%. Por lo tanto, se puede decir que el método permite cuantificar con exactitud los tres analitos dentro del rango definido anteriormente.

### D. REPETIBILIDAD

Este parámetro se evalúa a lo largo de un período de tiempo, en el caso de esta investigación fue a lo largo de tres semanas, realizando lecturas tres días en cada semana, de soluciones preparadas con el mismo procedimiento por el mismo analista, utilizando el mismo equipo, cristalería y reactivos. Se utilizó como estadístico el coeficiente de variación, también conocido como RSD% y se comparó con el coeficiente de variación predicho por la ecuación de Horwitz (PRSD<sub>r</sub>%). Siguiendo las recomendaciones de la ICH se evalúa la repetibilidad en tres niveles de concentración distintos, cada uno realizado en triplicado, dentro del rango de linealidad de cada analito, como se puede observar en el Cuadro 18 en la sección de resultados.

Al observar los resultados obtenidos para el sodio y zinc en los tres niveles evaluados y compararlos con su respectivo PRSD<sub>r</sub>%, se puede notar que en las tres semanas se mantienen los valores de RSD% por debajo de lo predicho. Esto indica que para estos analitos se puede asegurar que hay una buena repetibilidad en los tanto a una concentración baja (0.25 ppm), media (0.5 ppm) y alta (0.7 ppm).

En el caso del calcio, al observar los resultados en el Cuadro 18 se puede notar que se obtienen valores altos de RSD%, por encima del PRSD<sub>r</sub>%, para 4 de 9 resultados. Esto podría explicarse ya que las absorbancias obtenidas para las concentraciones trabajadas son bajas, como se puede observar en el Cuadro 24 en anexos. Al tener lecturas tan bajas para la absorbancia, una diferencia de decimales causa que el RSD% sea elevado y se salga del PRSD<sub>r</sub>%. Es importante notar que en la experimentación se observó que la llama es sensible a residuos que puedan quedar en el quemador o a impurezas presentes en gas utilizado para la ignición de la llama, causando así que la absorbancia detectada varíe notablemente si no se realizan lavados entre las soluciones. Por lo tanto, para el calcio no fue posible asegurar la repetibilidad en el rango trabajado a lo largo de un período de tiempo. Una posible recomendación para esto es evaluar si al trabajar con un rango de concentraciones más alto es posible validar este parámetro.

## E. ESPECIFICIDAD

Evaluar la especificidad permite conocer si el método analítico utilizando no se ve afectado por los otros componentes que están presentes en la matriz de una muestra. En esta investigación, para evaluar este parámetro se adiciona una cantidad de muestra a la curva de calibración y se compara la pendiente de esta curva con la de una que únicamente contiene estándares. Si estas son estadísticamente similares significa que el método analítico es específico para el elemento que se está cuantificando.

Para ello, se realizaron dos pruebas estadísticas: el ensayo F y la prueba t, la cual es para varianzas homogéneas. La primera indica si las varianzas son homogéneas y la segunda indica si dos datos son estadísticamente similares. Ambas pruebas se realizan con un nivel de confianza del 95%, por lo que  $\alpha = 0.05$ . El criterio para la primera prueba es que el  $F_{teórico} > F_{calculado}$ ; para la segunda prueba,  $t_{teórico} > t_{calculado}$ . Como se puede observar en el Cuadro 13, 14 y 15, se tiene que tanto para el sodio como para el calcio y zinc se cumple la primera prueba por lo que se puede concluir que las pendientes tienen varianzas homogéneas. Al saber esto, se puede aplicar la prueba t, la cual también cumple con el criterio establecido para los tres elementos. Por lo tanto, se puede concluir que el sodio, calcio y zinc cumplen con especificidad.

## F. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO

Una vez que se han realizado las pruebas necesarias para los parámetros que se desea evaluar, se busca implementar el método analítico para cuantificar sodio, calcio y zinc en muestras de sueros de rehidratación oral (SRO). Para ello se compraron SRO de dos lotes distintos en supermercados locales marca A, para cuantificar sodio y calcio, y marca B, para cuantificar sodio y zinc. Las muestras se realizaron en triplicado y

se trabajó con un promedio para obtener el porcentaje de recuperación y error respecto al valor teórico reportado por los fabricantes. Estos datos se reportan en el Cuadro 19 de la sección de resultados.

Como se puede observar en dicho cuadro, para el sodio en ambas marcas SRO de los dos lotes evaluados se obtuvieron errores bajos y un porcentaje de recuperación dentro de un rango aceptable. Esto mismo se puede observar también para los resultados al cuantificar zinc. Esto está en concordancia con que para estos elementos se tiene que todos los parámetros evaluados dieron resultados positivos. En contraparte, se puede observar que al cuantificar el calcio se obtiene el mayor error y el porcentaje de recuperación se encuentra fuera del rango aceptable. Esto se puede explicar con el hecho de que, según los resultados obtenidos en la validación, es posible que no se esté trabajando en un rango donde se puedan obtener lecturas confiables. Por lo tanto, esto sirve para confirmar la necesidad de realizar pruebas para definir cuál sería el rango ideal para cuantificar el calcio por medio del espectrofotómetro de absorción atómica con el que se cuenta.

## VIII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos para el sodio y zinc se logró determinar que los parámetros de linealidad, exactitud, especificidad y repetibilidad son aceptables para la cuantificación de estos elementos por medio de espectrofotometría de absorción atómica. Se puede asegurar lo anterior en un rango de 0 a 0.9 ppm para ambos elementos. Para el sodio, se determinó que el límite de detección y cuantificación es de 0.1012 ppm y 0.3068 ppm, respectivamente; para el zinc, es de 0.2881 ppm y 0.8731 ppm. Además, fue posible cuantificar tanto el sodio como el zinc exitosamente en sueros de rehidratación oral. Por lo tanto, se concluye que este método fue validado.

Respecto a los resultados obtenidos para el calcio, fue posible determinar que los parámetros de linealidad, exactitud y especificidad son aceptables para la cuantificación por medio de espectrofotometría de absorción atómica dentro de un rango de 0.75 a 4.5 ppm. Se estableció que el límite de detección es de 0.2881 ppm y el de cuantificación es de 0.8731 ppm. Sin embargo, no fue posible obtener un resultado concluyente para la repetibilidad, ya que el límite de cuantificación resultó ser mayor al previsto según la teoría. Adicionalmente, algunos factores externos que pudieron influir son residuos en el quemador e impurezas en el gas utilizado para la ignición de la llama. Por lo tanto, al evaluarse la repetibilidad en concentraciones menor a este límite no se puede asegurar que los resultados sean confiables. Finalmente, al cuantificar el calcio en sueros de rehidratación oral, los resultados no fueron óptimos, lo cual puede estar relacionado a haber trabajado con soluciones por debajo del límite de cuantificación. Debido a esto, no fue posible asegurar la repetibilidad del método analítico que se deseaba validar.

## IX. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que se determinó que se estaba trabajando debajo del límite de cuantificación para el calcio y el posible efecto que esto implica en la poca repetibilidad encontrada para el método analítico validado, se recomienda realizar futuras investigaciones para comprobar cuál es el rango ideal de trabajo para la cuantificación de este elemento. Además, se recomienda implementar como buena práctica para el uso del equipo la limpieza de la línea de succión entre soluciones y evitar utilizar los últimos residuos del cilindro de gas, ya que esto evita posibles residuos en el quemador que afecten a la llama.

Además, es importante señalar que en esta investigación no se tuvo acceso a otros laboratorios ni a otros analistas para evaluar el parámetro de reproducibilidad y robustez. Por lo tanto, se recomienda que de ser posible se revisen estos parámetros en futuras investigaciones.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). *Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation*. The clinical biochemist reviews, 29(Suppl 1), S49.
- Beaty, R. D., & Kerber, J. D. (1993). *Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry*. The Perkin Elmer Corporation.
- Borman, P., & Elder, D. (2017). *Q2 (R1) validation of analytical procedures*. ICH Quality guidelines, 5, 127-166.
- Bridwell, H., Dhingra, V., Peckman, D., Roark, J., & Lehman, T. (2010). *Perspectives on method validation: importance of adequate method validation*. The Quality Assurance Journal, 13(3-4), 72-77.
- Comisión Guatemalteca de Normas [COGUANOR]. (2017). *Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*
- Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano [ICH]. (2022). *Directriz Q2(E2) sobre validación de procedimientos analíticos*.
- Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano. (1994). *Directriz ICH Q2 (R1): Validación de procedimientos analíticos: texto y metodología*.
- Dean, J.R. (2019). *Practical Inductively Coupled Plasma Spectrometry*. John Wiley and Sons Editorial. ISBN: 9781119478683
- de Materán, M. R., Tomat, M., Pérez, D., Roa, B., y Meneses, R. (2009). *Terapia de rehidratación oral*. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, 72(4), 146-153.
- Farmacopea de Estados Unidos. (2021). *USP 40 NF 35. Validación de procedimientos compendiales 1225*.
- Farrukh, M. A., (Ed.). (2012). *Atomic Absorption Spectroscopy*. IntechOpen. doi.org/10.5772/1090



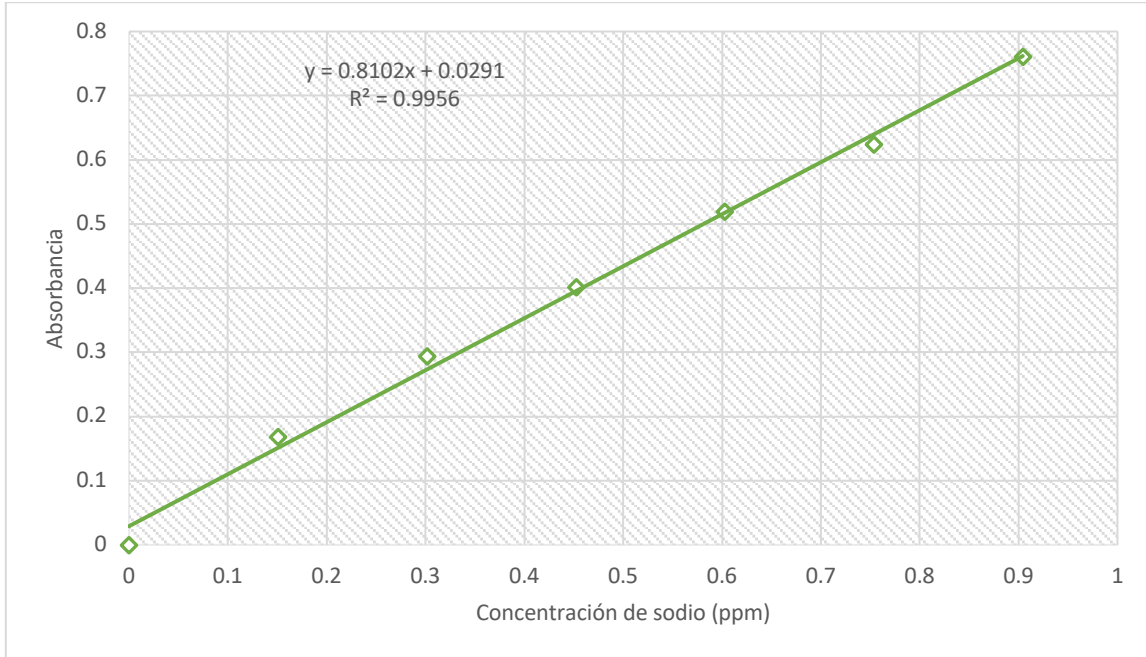
- Gallegos W., M. Vega y P. Noriega. (2012). *Espectroscopia de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos*. La Granja, Revista de ciencia de la vida. 15(1): 18-25. ISSN: 1390-3799.
- Hill, S.J. (2007). *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Editorial Wiley-Blackwell. ISBN: 1405135948
- Hill, S. J., & Fisher, A. S. (2017). *Atomic Absorption, Methods and Instrumentation*. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 37–43 pp. doi:10.1016/b978-0-12-803224-4.00099-6
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales [IDEAM]. (2020). *Instructivo de lavado de material de vidrio y plástico*. Colombia.
- López, E. P., & Rodríguez, D. C. A. (2018). *Cuantificación por absorción atómica de Cu, Fe y Zn en alcohol destilado y agua*. Cuadernos de Investigación UNED, 10(2), 387-396.
- Mahmoud, M. H., Wahba, H. M. A. y Mahmoud, M. H. (2019). *Evaluation of a new baby food prepared from Opuntia ficus indica fruit in Wistar rats with either calcium deficient or vitamin A depletion*. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research| Jul-Sep, 9(3).
- Molina Cabañero, J. (2019). *Deshidratación. Rehidratación oral y nuevas pautas de rehidratación parenteral*. Servicio de urgencias. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, 98-105.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito [UNODC]. (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*. Nueva York.
- Oficina de Programas de Pesticidad de la Agencia de Protección Ambientas. (2018). *Procedimiento Operativo Estándar para Verificación de Pipetas QC-19-09*. Estados Unidos de América (EE.UU).
- Organización Internacional para la Estandarización [ISO]. (2015). *Norma ISO 9001:2015. Sistemas de Gestión de Calidad*.
- Orozco, C. A. R., & Báez, M. D. R. R. (2010). *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006*. In *Simposio de Metrología, Centro Nacional de Metrología SM2010-S5C-3, Chihuahua, Mexico* (Vol. 10).

- Ozkan, S. A. (2018). *Analytical method validation: the importance for pharmaceutical analysis*. Pharm Sci, 24(1), 1-2.
- Paudel, S., Kumar, S., & Mallik, A. (2021). *Atomic absorption spectroscopy: a review*. EPRA International Journal of Research and Development. 6(9), 1-6. ISSN: 2455-7838
- Penner, M. H. (2017). *Basic principles of spectroscopy*. In *Food analysis*. Food Science Text Series, 79 - 88 pp. doi: 10.1007/978-3-319-45776-5\_6.
- Pérez-López, E. y Esquivel-Arias, R. (2018). *Adecuación de metodologías para análisis de sodio y potasio por espectroscopía de absorción atómica, en sales de rehidratación oral*. Revista Tecnología en Marcha, 31(2), 40-57.
- Perkin Elmer Corporation. (1996). *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*. United States of America.
- Rodríguez, A. C. R., Saucedo, B. L., Chávez, L. M., Sierra, J. M., y Subirat, M. Z. (2005). *Validación de un método de determinación de Na, K, Cd, Pb y Hg por Espectrometría de Absorción Atómica en policosanol y extracto purificado de cera de caña*. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 36(1), 9-14.
- Skoog, D.A, Holler, F.J y Crouch, S.R. (2015). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning. México, D.F.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis (7ma ed.)*. Cengage Learning.
- Slezák, P., & Waczulíková, I. (2011). *Reproducibility and repeatability*. *Physiol Res*, 60, 203-205.

## XI. ANEXOS

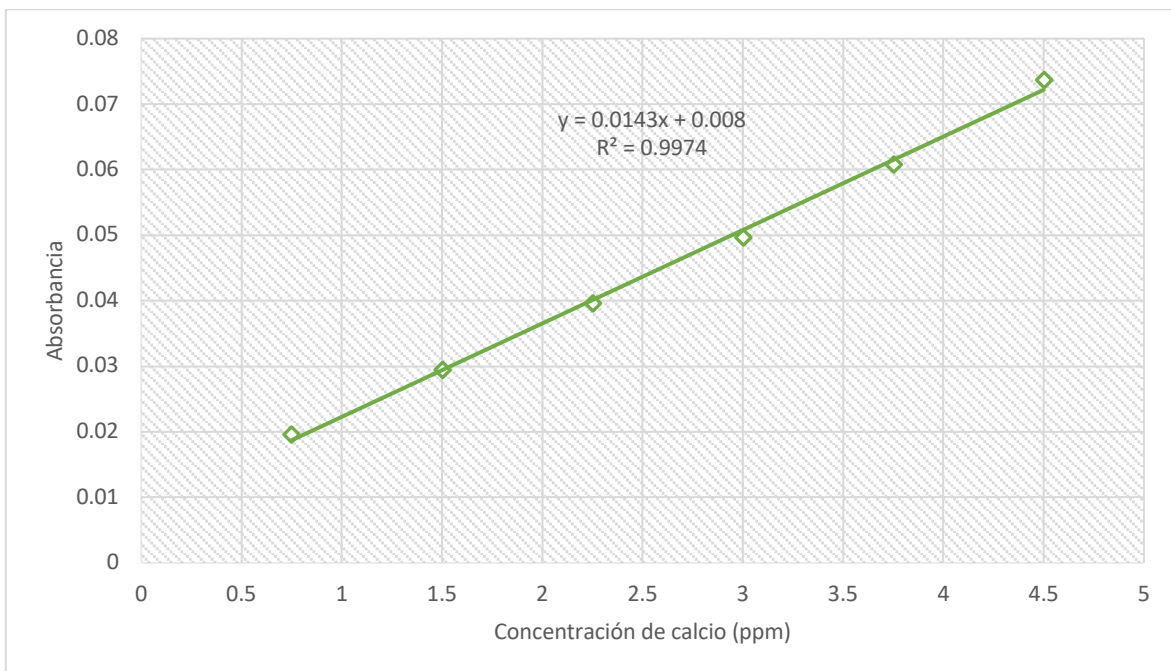
### A. FIGURAS

Figura 1. Curva de regresión de sodio para evaluar la linealidad.



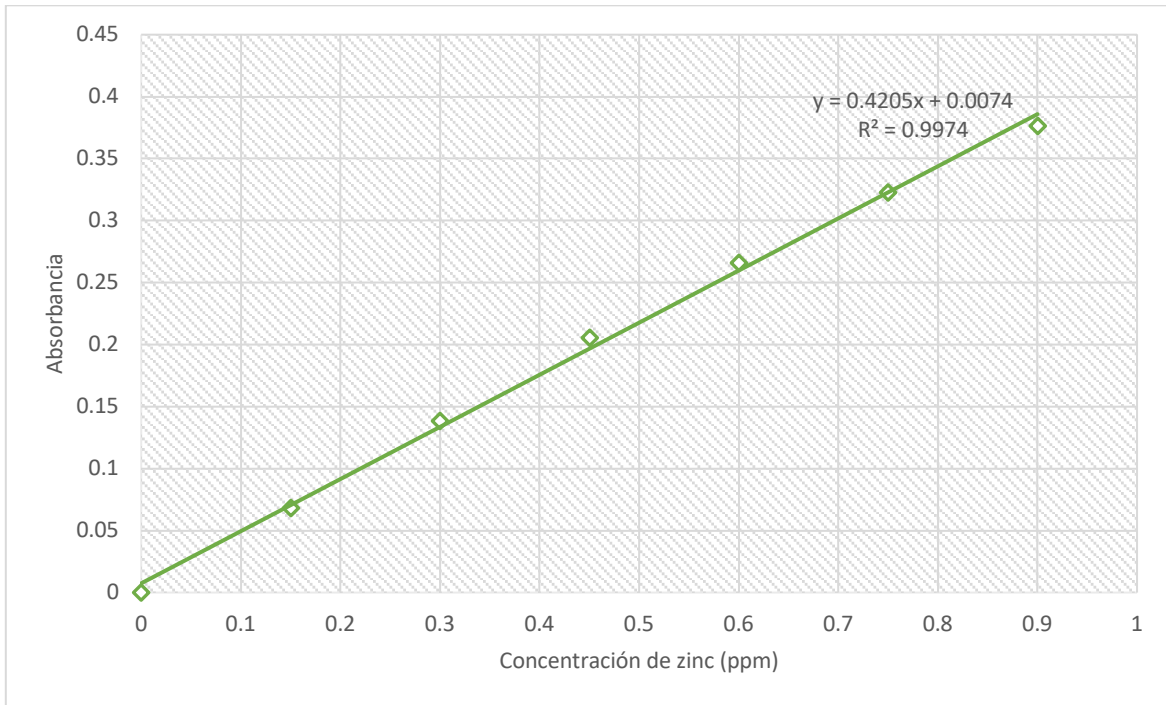
La curva de regresión anterior se elaboró con los datos presentados en el Cuadro 20 en esta misma sección.

Figura 2. Curva de regresión de calcio para evaluar la linealidad



La curva de regresión anterior se elaboró con los datos presentados en el Cuadro 21 en esta misma sección.

Figura 3. Curva de regresión de zinc para evaluar la linealidad



La curva de regresión anterior se elaboró con los datos presentados en el Cuadro 22 en esta misma sección.

Figura 4. Curva de regresión de sodio para evaluar la especificidad

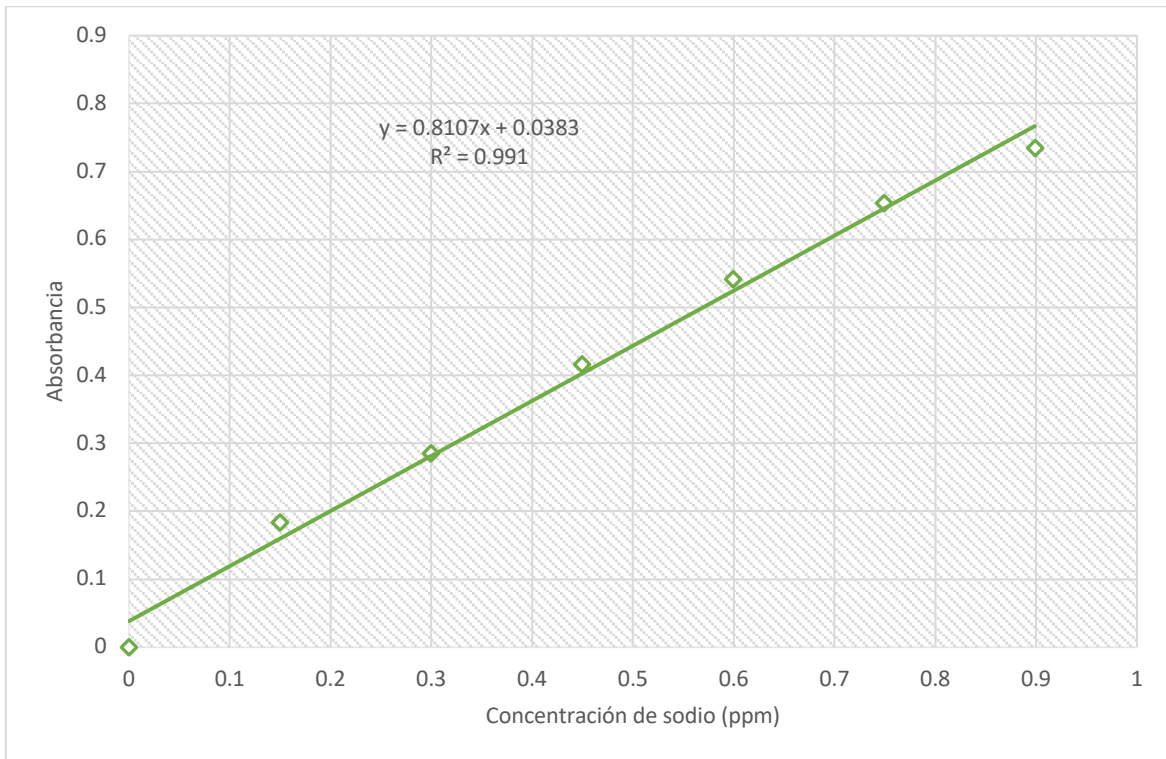


Figura 5. Curva de regresión de sodio para evaluar la especificidad adicionando suero marca A

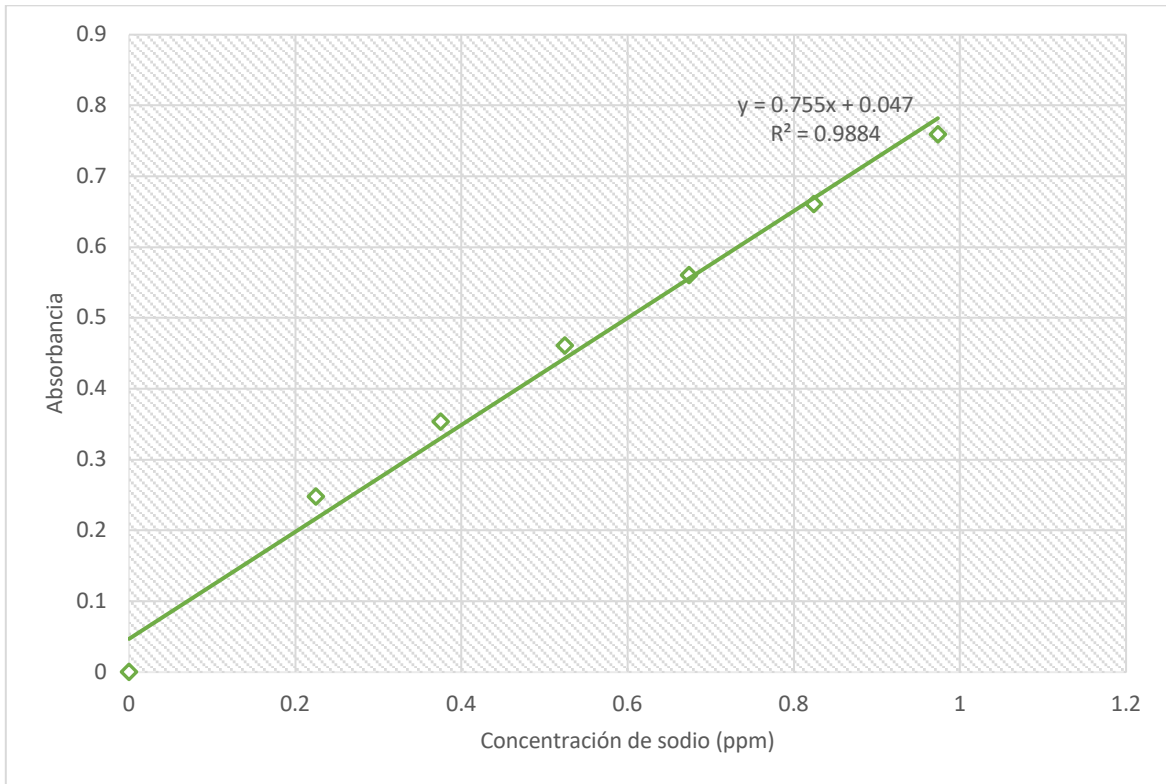


Figura 6. Curva de regresión de sodio para evaluar la especificidad adicionando suero marca B

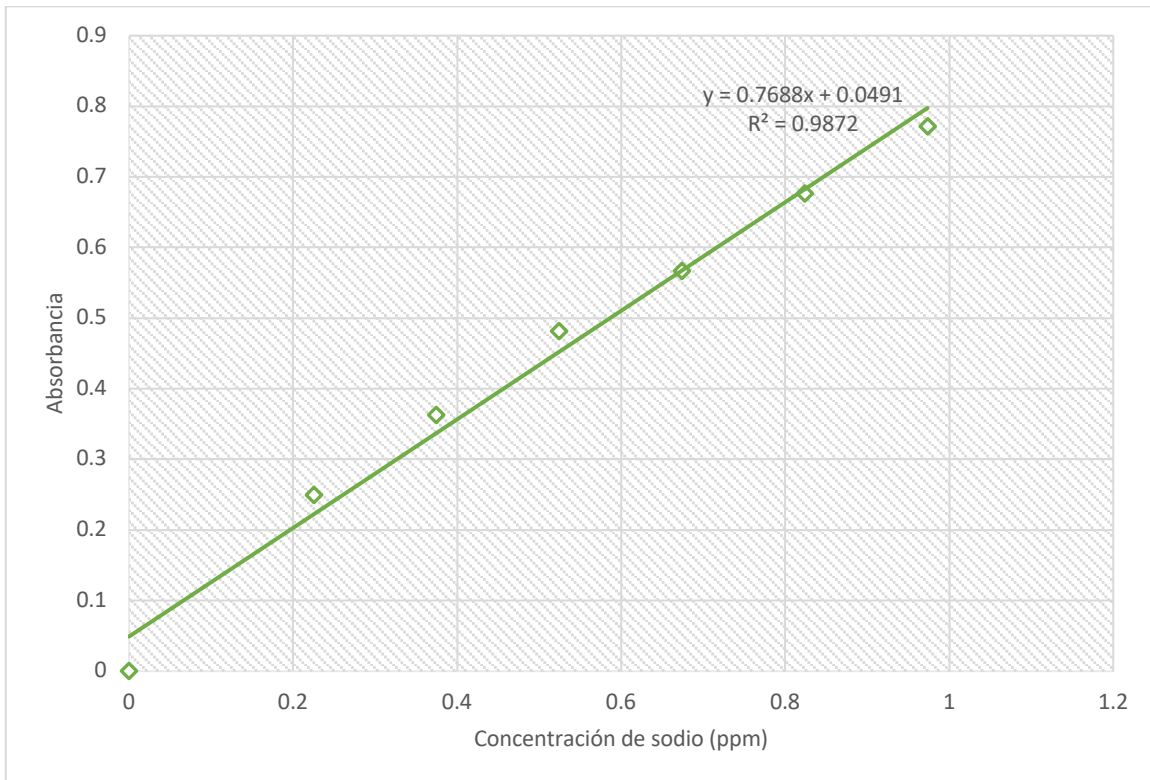


Figura 7. Curva de regresión de calcio para evaluar la especificidad

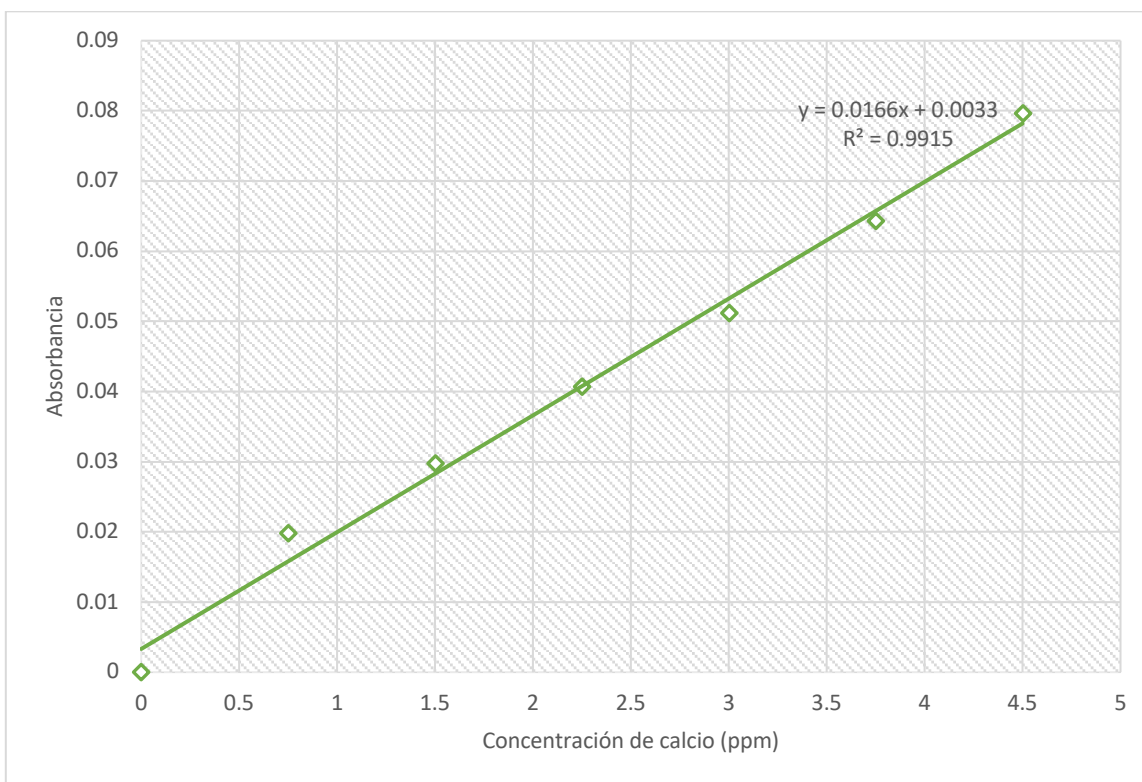


Figura 8. Curva de regresión de calcio para evaluar la especificidad adicionando suero marca A

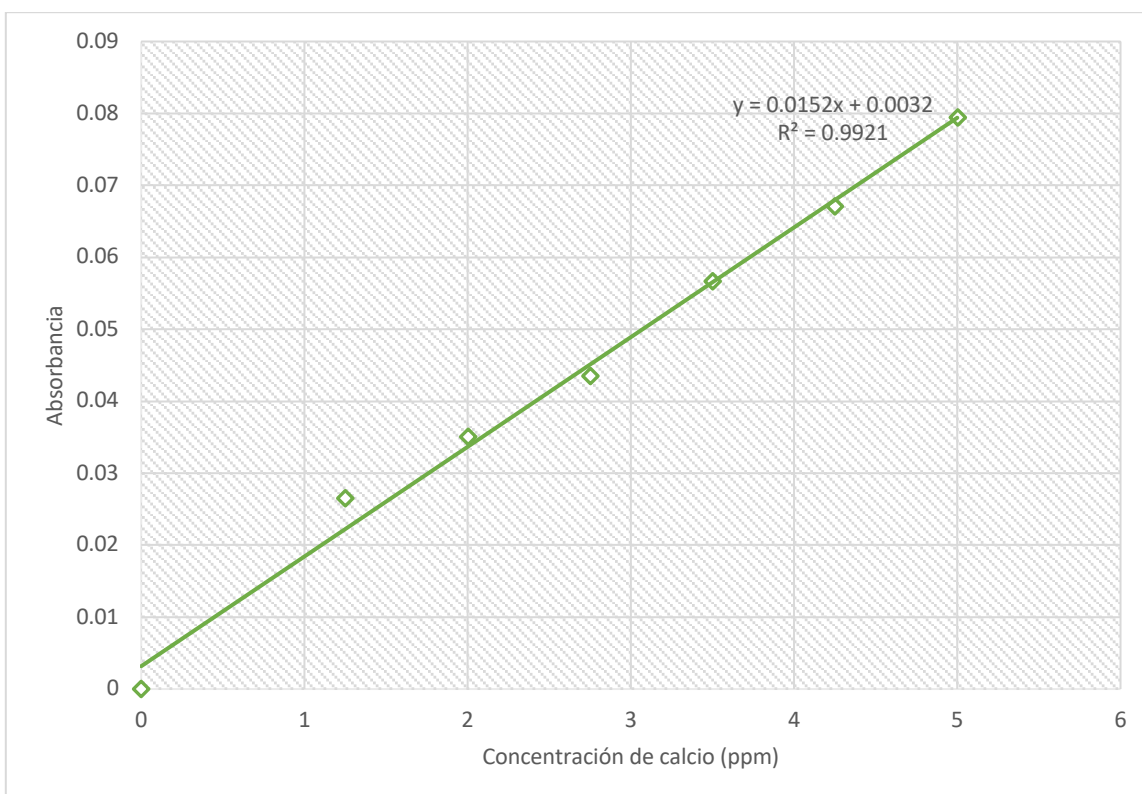


Figura 9. Curva de regresión de zinc para evaluar la especificidad

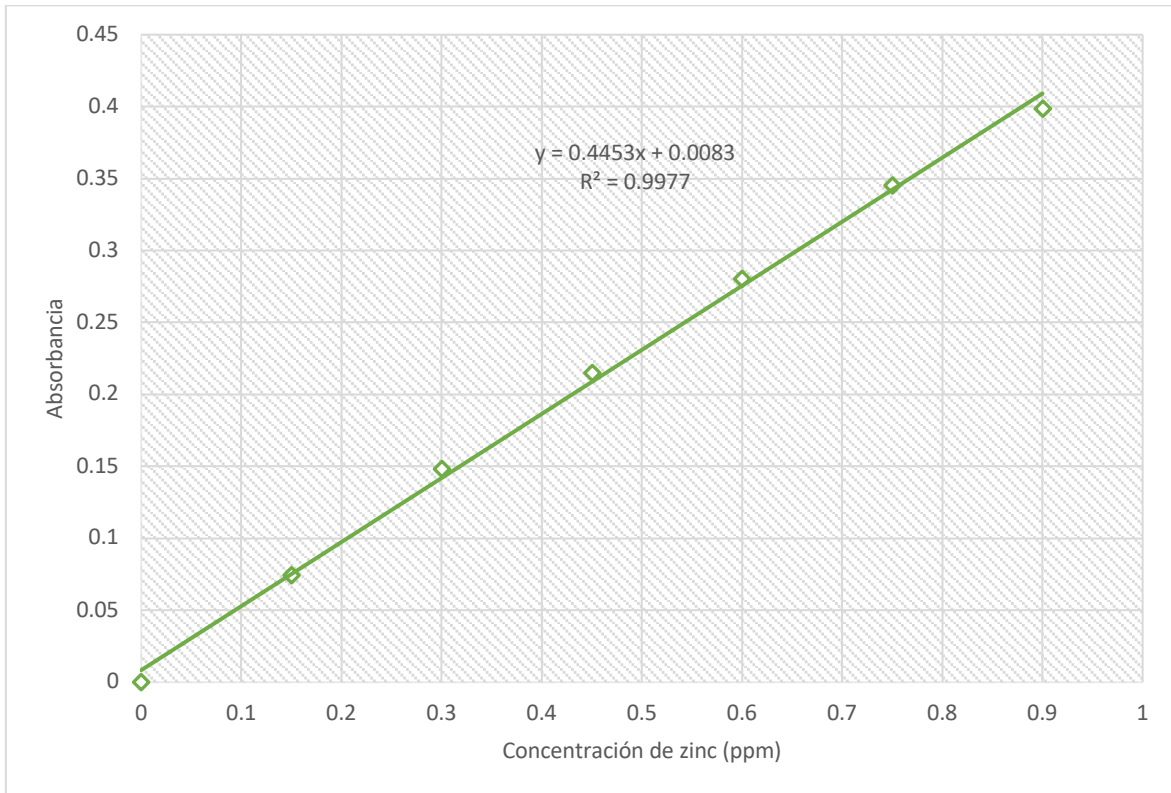


Figura 10. Curva de regresión de zinc para evaluar la especificidad adicionando suero marca B

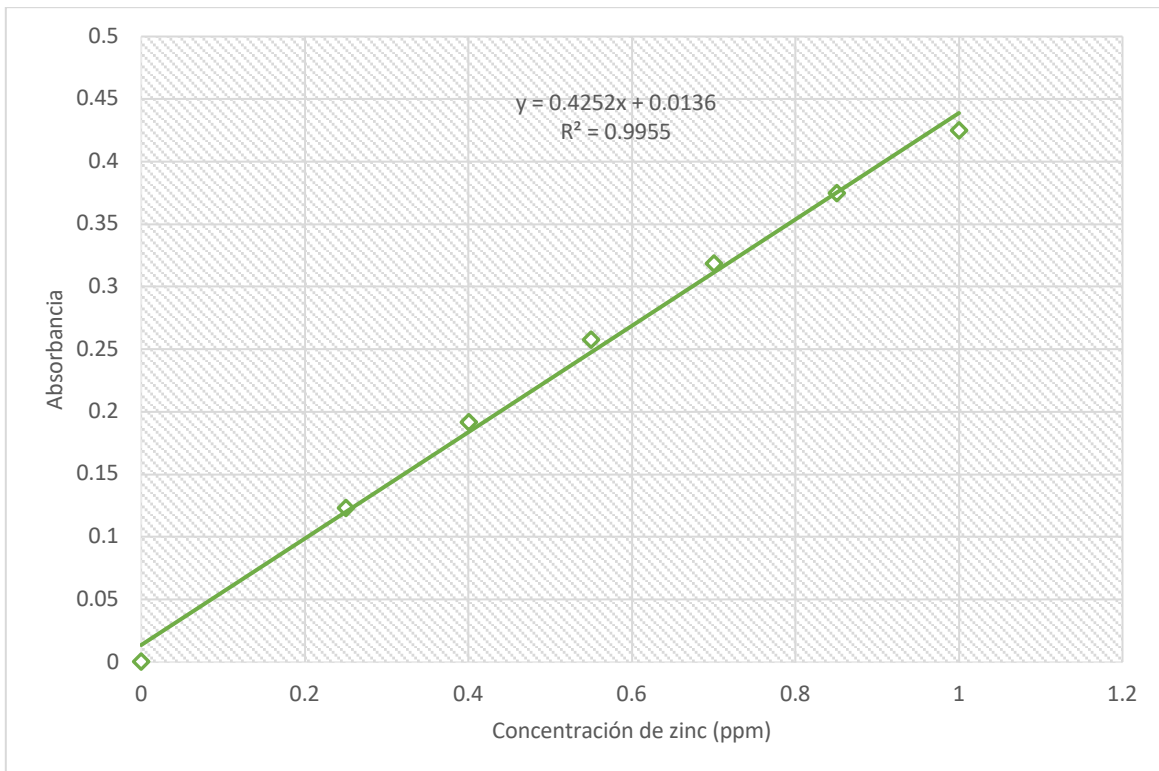
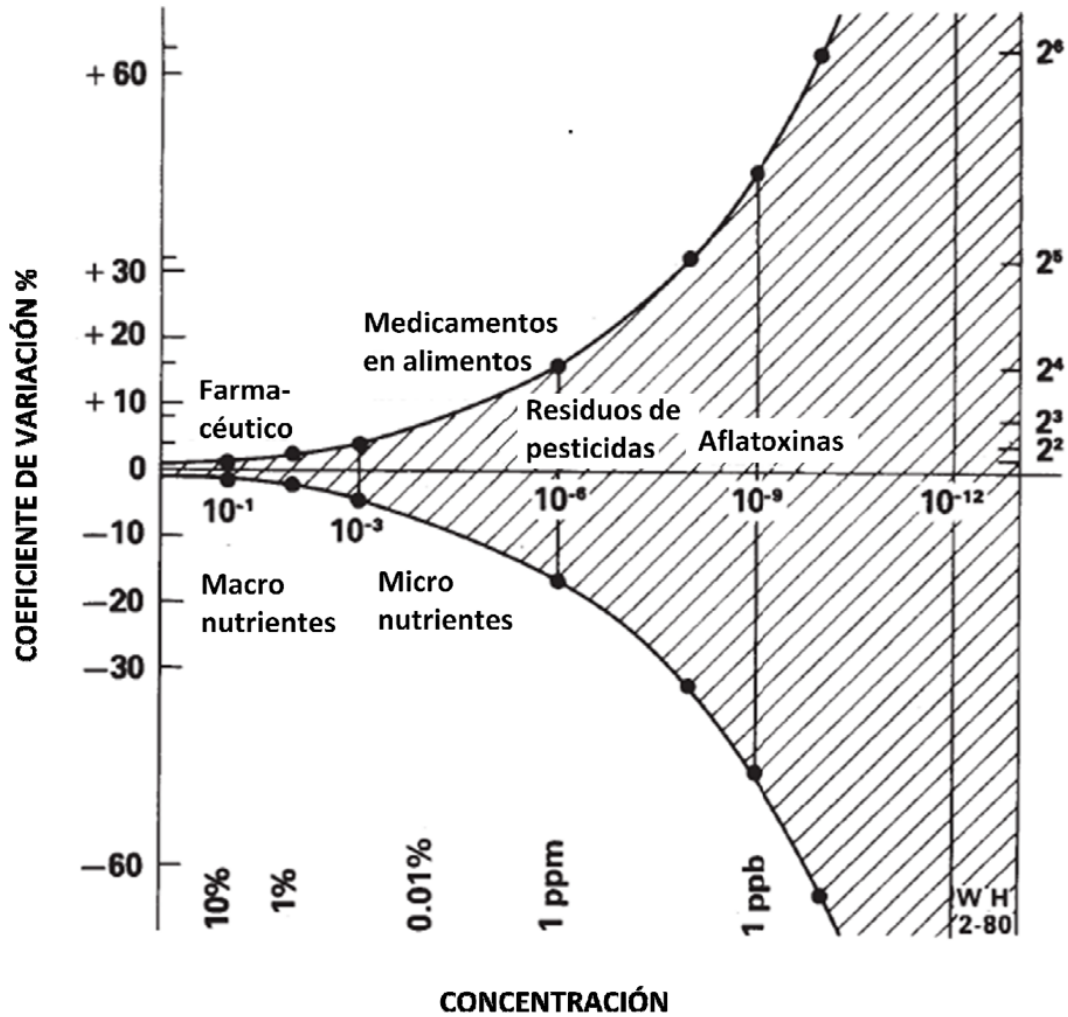


Figura 11. Trompeta de Horwitz



## B. DATOS UTILIZADOS PARA CALULAR PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Cuadro 20. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de sodio para evaluación de linealidad

Concentración (ppm)	Absorbancia
0.15	0.1683 ± 0.0143
0.30	0.2940 ± 0.0202
0.45	0.4015 ± 0.0170
0.60	0.5197 ± 0.0184
0.75	0.6241 ± 0.0280
0.90	0.7605 ± 0.0327



Cuadro 21. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de calcio para evaluación de linealidad

Concentración (ppm)	Absorbancia
0.75	0.0196 ± 0.0027
1.50	0.0295 ± 0.0039
2.25	0.0396 ± 0.0037
3.00	0.0496 ± 0.0049
3.75	0.0607 ± 0.0078
4.50	0.0737 ± 0.0119

Cuadro 22. Datos obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de zinc para evaluación de linealidad

Concentración (ppm)	Absorbancia
0.15	0.0680 ± 0.0075
0.30	0.1382 ± 0.0085
0.45	0.2055 ± 0.0132
0.60	0.2656 ± 0.0152
0.75	0.3229 ± 0.0158
0.90	0.3763 ± 0.0199

Cuadro 23. Coeficientes de variación para condiciones de repetibilidad (RSD<sub>r</sub>%) predichos por la ecuación de Horwitz para cada analito según su concentración

Elemento	Concentración evaluada (ppm)	RSD <sub>r</sub> %
Sodio	0.25	9.86
	0.5	8.88
	0.7	8.44
Calcio	1	8.00
	2.5	6.97
	3.5	6.63
Zinc	0.25	9.86
	0.5	8.88
	0.7	8.44

Cuadro 24. Lecturas de absorbancia de las soluciones para evaluar la repetibilidad del sodio, calcio y zinc

Elemento	Semana	Concentración	Absorbancia
Sodio	1	0.25	0.3046
		0.7	0.5193
		0.9	0.5833
	2	0.25	0.2623

Elemento	Semana	Concentración	Absorbancia
		0.7	0.4497
		0.9	0.5971
	3	0.25	0.2450
		0.7	0.4488
		0.9	0.5970
Calcio	1	1	0.0224
		2.5	0.0420
		3.5	0.0570
	2	1	0.0179
		2.5	0.0302
		3.5	0.0431
	3	1	0.0231
		2.5	0.0401
		3.5	0.0544
Zinc	1	0.25	0.1216
		0.7	0.2306
		0.9	0.3100
	2	0.25	0.1095
		0.7	0.2141
		0.9	0.2906
	3	0.25	0.1172
		0.7	0.2334
		0.9	0.3015

## C. CERTIFICADO DE MANTENIMIENTO DEL EQUIPO DE ABSORCIÓN ATÓMICA

El mantenimiento se realizó el 16 de junio de 2022 por la empresa Analítica Química Internacional utilizando la lámpara de cobre para realizar las pruebas en el equipo de absorción atómica Perkin Elmer PinAAcle 900F con llama de acetileno.

### Mantenimiento Preventivo - Analítica Química

Seq. No.	1	AS Loc:		Date: 6/16/2022			
Sample ID:	Blank	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
Analyte	Corr. Absorbance						
<b>Cu 324.75</b>	0.4366	[0.00]	mg/L				10:00:32AM
	0.4366	[0.00]	mg/L				10:00:42AM
	0.4366	[0.00]	mg/L				10:00:53AM
	0.4366	[0.00]	mg/L				10:01:03AM
	0.4367	[0.00]	mg/L				10:01:14AM
	0.4367	[0.00]	mg/L				10:01:24AM
	0.4367	[0.00]	mg/L				10:01:34AM
	0.4367	[0.00]	mg/L				10:01:45AM
	0.4367	[0.00]	mg/L				10:01:55AM
	0.4367	[0.00]	mg/L				10:02:05AM
<b>Mean:</b>	0.4367	[0.00]	0.0000 mg/L			0.0047	

Seq. No.	2	AS Loc:		Date: 6/16/2022			
Sample ID:	Filtro D.O. 0.2 Abs	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
Analyte	Corr. Absorbance						
<b>Cu 324.75</b>	0.1800						10:05:26AM
	0.1800						10:05:36AM
	0.1800						10:05:47AM
	0.1800						10:05:57AM
	0.1800						10:06:07AM
	0.1800						10:06:18AM
<b>Mean:</b>	0.1800						

Seq. No.	3	AS Loc:		Date: 6/16/2022			
Sample ID:	Filtro D.O. 1 Abs	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
Analyte	Corr. Absorbance						
<b>Cu 324.75</b>	0.8701						10:07:47AM
	0.8701						10:07:57AM
	0.8702						10:08:08AM
	0.8702						10:08:18AM
	0.8702						10:08:29AM
	0.8702						10:08:39AM
<b>Mean:</b>	0.8702						

Seq. No.	4	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Sample ID:	Filtro D.O. 2 Abs	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
<b>Cu 324.75</b>	2.2625						10:09:39AM
	2.2612						10:09:50AM
	2.2625						10:10:00AM
	2.2614						10:10:10AM
	2.2617						10:10:21AM
	2.2623						10:10:31AM
<b>Mean:</b>	2.2620						

Seq. No.	5	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Sample ID:	Linea Base	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
<b>Cu 324.75</b>	-0.0001						10:11:51AM
	-0.0001						10:12:01AM
	-0.0001						10:12:12AM
	-0.0001						10:12:22AM
	-0.0001						10:12:33AM
	-0.0001						10:12:43AM
<b>Mean:</b>	-0.0001						

Seq. No.	6	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Sample ID:	Blanco	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
<b>Cu 324.75</b>	0.4578	[0.00]		mg/L			12:10:16PM
	0.4578	[0.00]		mg/L			12:10:21PM
	0.4578	[0.00]		mg/L			12:10:26PM
<b>Mean:</b>	0.4578	[0.00]	0.0000	mg/L		0.0022	

Seq. No.	7	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Sample ID:	Filtro D.O. 0.2 Abs	AS Loc:			Date:	6/16/2022	
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time
<b>Cu 324.75</b>	0.1798						12:10:53PM
	0.1798						12:10:58PM
	0.1798						12:11:03PM
<b>Mean:</b>	0.1798						

Seq. No.	8	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Sample ID:	Filtro D.O. 1 Abs	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time	
Cu 324.75	0.8709						12:11:40PM	
	0.8708						12:11:45PM	
	0.8709						12:11:50PM	
Mean:	0.8709							

Seq. No.	9	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Sample ID:	Filtro D.O. 2 Abs	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time	
Cu 324.75	2.2686						12:12:48PM	
	2.2696						12:12:54PM	
	2.2700						12:12:59PM	
Mean:	2.2694							

Seq. No.	10	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Sample ID:	Linea Base	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time	
Cu 324.75	-0.0001						12:13:23PM	
	-0.0001						12:13:28PM	
	-0.0001						12:13:33PM	
Mean:	-0.0001							

Seq. No.	11	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Sample ID:	Oclusion	AS Loc:			Date:	6/16/2022		
Analyte	Corr. Absorbance	Conc (Calib)	Std. Dev.	Conc (Sample)	Std. Dev.	%RSD:	Time	
Cu 324.75	3.2851						12:13:48PM	
	3.2979						12:13:54PM	
	3.2820						12:13:59PM	
Mean:	3.2883							

## D. PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PARA EL FUNCIONAMIENTO BÁSICO DEL ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA PERKIN ELMER PINAACLE 900F.

Universidad del Valle de Guatemala	Procedimiento Operacional Estándar.	POE: 1.2 Versión: 3 Fecha: 17 de marzo de 2022
Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada	FUNCIONAMIENTO BÁSICO DEL ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA PERKIN ELMER PINAACLE 900F	Preparado por: Eva Vásquez y Ximena Contreras Revisado por: A. de Montenegro

### 1. OBJETIVO

Dar a conocer los pasos para extraer los datos y generar un reporte de un análisis en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer PinAAcle 900F.

### 2. RESPONSABLES

- a. Personal operador autorizado del espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer PinAAcle 900F.
- b. Personal asignado al manejo del equipo.

### 3. PROCEDIMIENTO

Encendido y preparación del equipo

- Abrir el cilindro de acetileno.
- Encender la computadora.
- Abrir Software WinLab 32 AA Versión 7.3.
- Encender el espectrómetro y esperar a que haya una conexión entre el equipo, la llama y el software.
- Seleccionar la opción Workspace (Wrkspe) que se encuentra en la parte superior izquierda.
- Se escoge el método a utilizar. Se abrirán las pestañas de Manual Analysis Control, Calibration y Flame Control.
- Luego, se selecciona Lamps, que se encuentra en la parte superior izquierda.
- Se escoge la lámpara a utilizar y se enciende. Nota: el botón de la columna de On/Off el botón se enciende en color verde.
- Se debe esperar al menos 10 minutos para que la lámpara se caliente. Esto se observa en la misma pestaña, en la sección Energy. Cerciorarse de la energía que debe alcanzar, ya que esto varía según la lámpara. Nota: en el caso de las lámparas de descarga de electrones, se debe calentar la lámpara por 1 hora.

Selección y configuración del método.

- Luego se selecciona a Method Editor (MethEd) que se encuentra en la parte superior izquierda.
- Se abrirá una ventana donde se coloca la descripción del método, es decir el elemento que se analizará.
- Cerciorarse que en la pestaña Spectrometer el elemento y el número de onda concuerde con el que se va a utilizar. Se selecciona la opción Settings, que está en la parte derecha, se coloca la cantidad de réplicas para cada lectura en el apartado Replicates.
- En la pestaña Sampler, cerciorarse que el oxidante seleccionado sea aire.

#### Configuración de la curva de calibración.

- En la pestaña Calibration, en el apartado Calibration Equation se escoge el tipo de ecuación. Usualmente se escoge la opción lineal con cálculo de intercepto. Se puede modificar el número de decimales y cifras significativas.
- En el apartado de Units se escogen las dimensionales para los estándares y muestra. En la parte derecha, se escoge la opción Standards Concentrations.
- Se despliega una tabla donde se debe colocar el ID del blanco y estándares y la concentración de los estándares.
- Asegurar que, en la columna AS Log, estén en orden desde el blanco hasta el estándar más concentrado. Nota: En la columna de concentraciones se deben poner las concentraciones reales de los estándares.
- Cerrar la pestaña y seleccionar la opción File que se encuentra en la barra superior izquierda. Seleccionar la opción Save > Method.

#### Configuración de la información de muestras.

- Para colocar los datos, seleccionar Sample Info (SampInfo) en la barra superior izquierda. Se coloca una descripción de las muestras que se analizarán. En Sample ID se coloca el nombre de las muestras.
- Si se tiene el dato de volumen y peso para la preparación de soluciones, se coloca esta información en las columnas Initial Sample Wt y Sample Prep. Vol.
- Nuevamente en la pestaña File, seleccionar Save > Sample Info.

#### Lectura de estándares.

- Encender la campana de extracción.
- Encender la lámpara en el interruptor que se encuentra en el software, en la pestaña Flame Control.
- Preparar dos erlenmeyer con suficiente agua destilada. Uno sirve de blanco y otro para hacer los lavados.
- Una vez encendida la lámpara, se procede a leer el blanco. Se coloca el succionador dentro de la solución del blanco y se asegura que el succionador esté completamente sumergido.
- Se esperan 5 segundos y, en el software, en la ventana Manual Analysis Control, se selecciona el botón Analyze Blank.
- Una vez realizada la lectura del blanco, se procede a retirar el succionador y se limpia con un KimWipe, se coloca en el erlenmeyer de lavado y se vuelve a limpiar.
- Para leer los estándares, en la ventana Manual Analysis Control en el apartado Standard, se selecciona el primer estándar.
- Se coloca el succionar dentro de la solución del primer estándar, se esperan 5 segundos y se selecciona el botón Analyze Standard.
- Una vez realizada la lectura, se coloca el succionador en el erlenmeyer de lavado y se limpia con un KimWipe. Esto se repite para todos los estándares.

#### Lectura de muestras.

- En la misma ventana de Manual Analysis Control, en el apartado de Sample se escoge el número de muestra en Sample No. y colocar el ID de muestra.
- Se repite el procedimiento de lectura y limpieza que se realiza con los estándares, con la solución de la muestra.

#### Exportación de datos.

##### Para generar un archivo PDF

- Seleccionar la ventana que se desea imprimir (por ejemplo, la ventana de Results).
- Seleccionar en la barra de herramientas superior, File > Print > Active Window.
- Seleccionar el formato PDF.

##### Para generar archivo de Excel

- Abrir el software Data Manager.
- En la pestaña que aparece al iniciar el software, escoger el archivo que se desea exportar.
- En las opciones de la barra superior, escoger la opción Export.
- Se abrirá una ventana, donde se habilita la opción Use Existing Design y escoger el diseño de exportación. Se presiona Next.
- En la pestaña que se abre, se desean los datos que se desean exportar. Por default, están seleccionados todos. Presionar Next.
- En la siguiente pestaña que se abre, Selected Analytes, se verifica que estén seleccionados únicamente los elementos que se analizaron. Presionar Next. Nota: En caso de que haya uno extra, se selecciona y se oprime el botón Remove.
- Se escoge el nombre con el que se desea guardar el archivo o se deja el nombre por default. En Extention, se escoge el tipo de archivo a exportar, en este caso se escoge csv. Se escoge el directorio para guardar el archivo. Presionar Next.
- Se seleccionan los parámetros que se desea que aparezcan en la tabla. Para agregar parámetros se presiona Add y para quitar se presiona Remove. Presionar Next.
- Se seleccionan parámetros estadísticos, de la misma manera que el paso anterior. Presionar Next.
- Se seleccionan los parámetros de los replicados. Presionar Next.
- Presionar Next. Se puede guardar el diseño presionando Save Desing y exportar los datos presionando Export.
- Se genera un csv que se puede modificar y pasar a formato de libro de Excel.

#### Apagado del equipo.

- Cerrar la llave de paso del cilindro del gas utilizado. Verificar que la llama se apague.
- En la ventana Flame Control, seleccionar Bleed Gases. Repetir este paso al menos 2 veces. Esto sirve para limpiar la línea del gas utilizado.
- Luego, en Lamps, apagar la lámpara (el botón debe pasar de verde a gris).
- Apagar la campana.
- Cerrar el software y apagar el equipo.

## E. PROCEDIMIENTO PARA VERIFICACIÓN DE PIPETAS

Se verifica las pipetas según el procedimiento descrito por la Oficina de Programas de Pesticidas de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (2018).

- Llenar un recipiente con agua destilada y permitir que se equilibre a la temperatura ambiente en el laboratorio.
- Colocar un recipiente pequeño y colocarlo en una balanza analítica y registrar su masa.
- Utilizar la pipeta que se desea verificar para medir una alícuota de agua destilada y colocarla en el recipiente pequeño.
- Registrar la nueva masa detectada por la balanza del recipiente pequeño con agua destilada.
- Repetir esta medición al menos cinco veces para cada alícuota que se añade. Es importante notar que luego de cada nueva adición no se debe tarar la balanza y se debe registrar la masa.
- Repetir el procedimiento para todas las pipetas que se deseen verificar.
- Obtener el porcentaje de inexactitud (%I) con la ecuación 9 y verificar que se encuentre entre  $\pm 5\%$ .

$$\%I = \frac{\bar{x} - \text{volumen ideal}}{\text{volumen ideal}} \times 100\% \text{ (Ecuación 9)}$$

Donde volumen ideal se refiere al volumen que en teoría de agregó con la pipeta y  $\bar{x}$  al promedio de las mediciones para cada alícuota añadida.



## F. PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA DE CRISTALERÍA

Se realiza la limpieza de beakers y balones volumétricos utilizados adaptando el procedimiento descrito por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (2020).

- Preparar 30 litros de una solución de detergente neutro o libre de fosfatos al 5%, con 28.5 L de agua del grifo y 1.5 L de detergente.
- Sumergir la cristalería en la solución de detergente por 30 a 60 minutos.
- Frotarla para eliminar cualquier residuo, enjuagar con abundante agua del grifo y dejar secar en gradillas
- Preparar 30 L de una solución de  $\text{HNO}_3$  al 5% y sumergir en esta la cristalería por 30 minutos.
- Sacar el material de la solución utilizando guantes de nitrilo, dejar escurrir y enjuagar con agua destilada. Dejar secar en gradillas.