

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA



TÍTULO: Determinación de Hierro Total en el fruto de Cassia grandis L. f. por Espectrofotometría Ultravioleta/Visible en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio-Diciembre, 2012.

AUTOR: Br. RÓGER ANTONIO JAIME MANZANAREZ

TUTOR: Ph.D. JORGE PITY TERCERO

TUTOR METODOLÓGICO: MSc. MARÍA NATALIA GUTIÉRREZ ARIAS

OBJETIVOS

❖ OBJETIVO GENERAL

Evaluar la concentración de hierro total en el fruto de Cassia grandis L. f. por Espectrofotometría Ultravioleta/Visible en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio – Octubre, 2012.

OBJETIVOS

❖ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Utilizar la información obtenida por medio de encuestas acerca de la forma tradicional que la población Nicaragüense emplea el fruto de Cassia grandis L. f. con fines medicinales para definir la matriz analito del estudio.*
- 2. Obtener la cantidad recobrada de hierro total presente en las cenizas totales del fruto de Cassia grandis L. f. utilizando el método de pretratamiento por combustión seca.*

OBJETIVOS

❖ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3. Determinar la concentración de hierro total en el fruto de *Cassia grandis* L. f. utilizando el Método colorimétrico de la Ortofenantrolina el cual obedece a la Ley de Lambert y Beer.*
- 4. Estimar la incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de hierro total determinadas en todas las muestras analizadas de *Cassia grandis* L. f.*

ANTECEDENTES

- 1987, Lizbeth González Valle (CITA, UCR) realizó un ***Estudio Preliminar Físico-Químico del Fruto del Carao.***
- 2000, Parra y Sardiñas (CIDEM, CITMA) comprobaron la ***Toxicidad Aguda Oral de 3 Formas Farmacéuticas de Cassia grandis L. f.***
- 2001, EIAG (Rivas, Nicaragua) culminó una investigación la cual tenía por objeto encontrar la dosis adecuada de la pulpa de carao para el control de la anemia en terneros.
- 2004, Capó et al. (CIDEM, CITMA) experimentaron la ***Actividad antianémica de la Cassia grandis L. f.***
- 2004, el Dr. Luis Carmona (UCR) utilizó el fruto del carao para efectuar un estudio de la anemia ferropénica en personas.
- 2004, simultáneamente la hija del Dr. Carmona, Ligia Carmona Infante, llevó a cabo un análisis químico de la composición aproximada de la pulpa de carao.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La población Nicaragüense ha utilizado tradicionalmente el fruto de la planta de carao como medicina alternativa para satisfacer la carencia de hierro en la hemoglobina de la sangre.

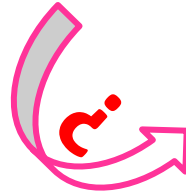
Sin embargo en el país se desconoce con exactitud la concentración de hierro total en el fruto del carao.



Debido a lo anterior, es necesario determinar el contenido de hierro total en la plántula de carao, puesto que de esta forma podrán establecerse los límites máximos permisibles de ingesta diaria para las personas que hacen uso del fruto de este árbol para sustentar la falta de este mineral.

JUSTIFICACIÓN

La población que utiliza la pulpa de la planta de carao mezclada con leche como un remedio alternativo para combatir la anemia ferropénica desconoce que los límites máximos permisibles de ingesta diaria dependen del déficit de hierro que presenta el organismo humano.



Más aún, suponiendo que se conociese la insuficiencia de hierro en una persona anémica sería imposible determinar la dosis adecuada de fruto de carao para contrarrestar la patología antes mencionada.

Por lo antes mencionado al conocer exactamente el contenido de hierro total presente en el fruto del carao, se podrán establecer mediante un balance nutricional los límites máximos permisibles de ingesta diaria del fruto del árbol de carao.

MARCO DE REFERENCIA

Generalidades de *Cassia grandis* L. f.

Nombre científico: *Cassia grandis* L. f.

Género: Cassia

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Caesalpinioideae

► HÁBITAT Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA



	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Hojas													
Flores													
Frutos													
Siembra													

Generalidades de *Cassia grandis* L. f.

► CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL FRUTO

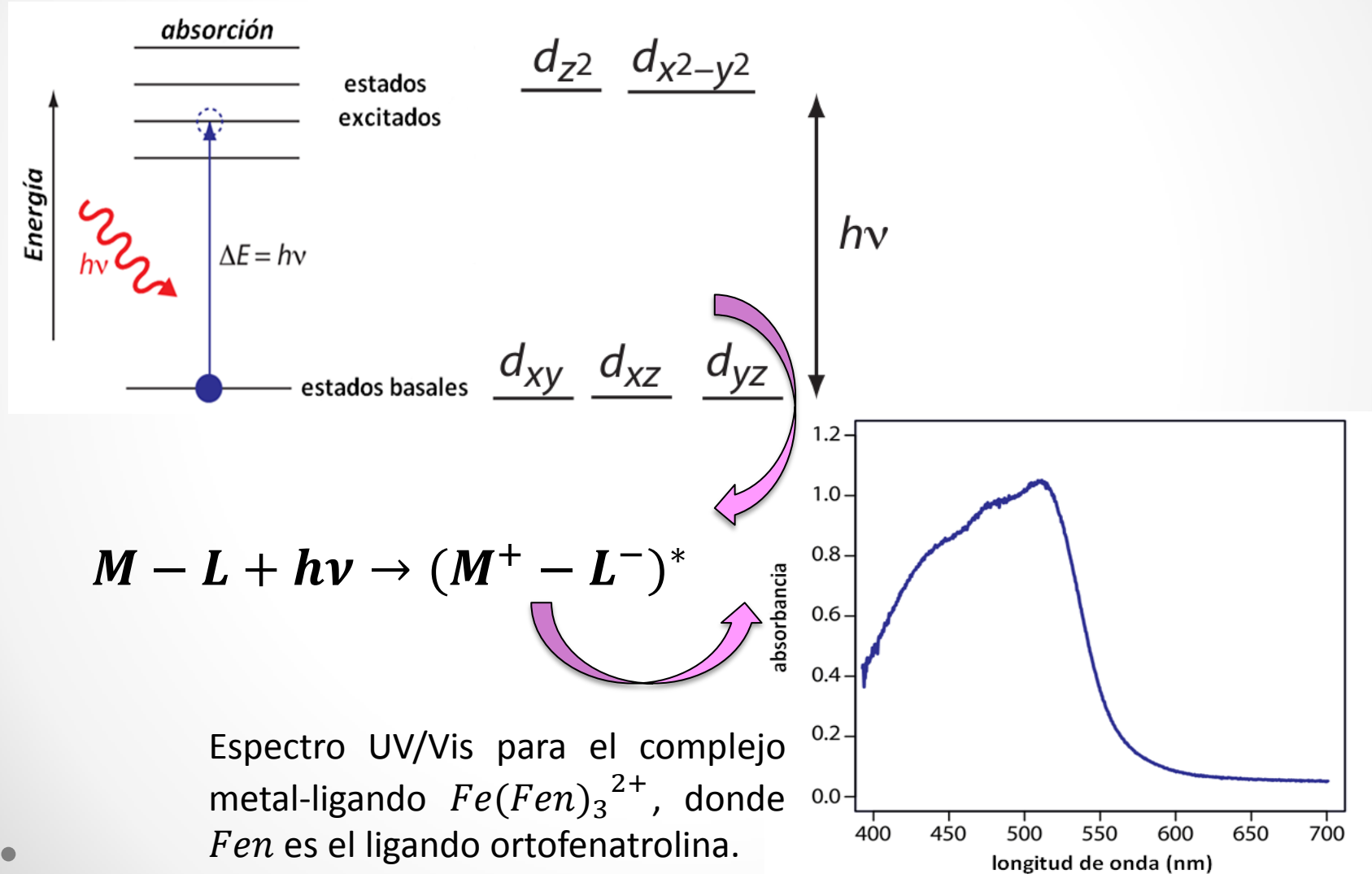
Composición aproximada de la pulpa de *Cassia grandis* L. f.

Macrocomponentes	%
Agua	35.0
Taninos	14.2
Ácido Cítrico	5.4
Carbohidratos	32.9
Cenizas	2.1
Minerales	
Calcio	51 ppm
Hierro	14 ppm
Magnesio	151 ppm
Fósforo	0.2 %

Fuente: Carmona L., 2004. Citada por Paull, 2008, pág. 386.

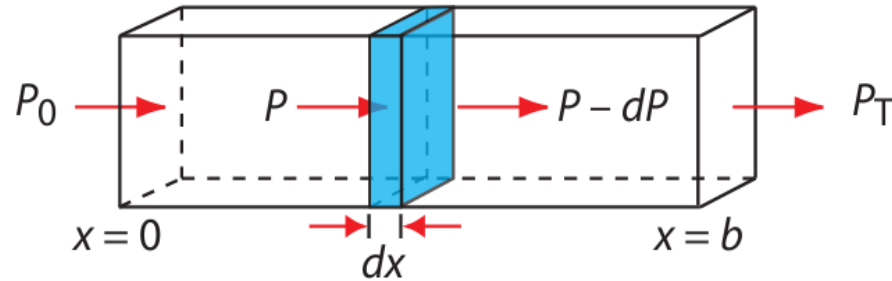
Espectrofotometría Ultravioleta/Visible (UV/VIS)

▶ ESPECTROSCOPIA BASADA EN ABSORCIÓN PARA IONES DE METALES DE TRANSICIÓN



Espectrofotometría Ultravioleta/Visible (UV/VIS)

► ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN: LEY DE LAMBERT Y BEER



$$-\frac{dP}{P} = \alpha C dx$$

$$-\int_{P_0}^{P_T} \frac{dP}{P} = \alpha C \int_0^b dx$$

$$\ln \frac{P_0}{P_T} = \alpha b C$$

$$A = \alpha b C \qquad A = \epsilon b C$$

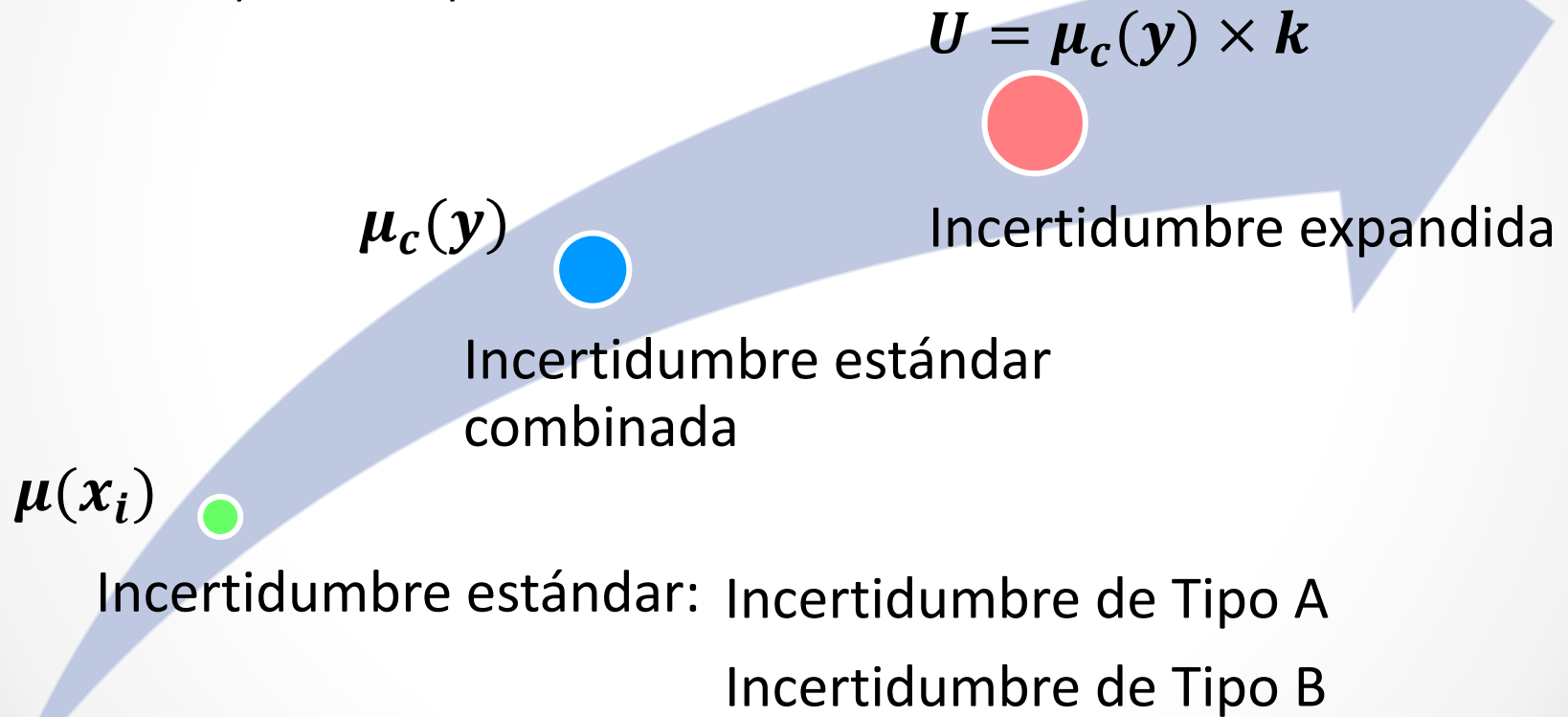
Ley de Lambert y Beer

Cuantificación y Reporte de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas

Guía Internacional:

Cuantificando Incertidumbre en Mediciones Analíticas,

QUAM:2012, publicada por EURACHEM/CITAC



Cuantificación y Reporte de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas

La Guía QUAM expone dos reglas simples para la combinación de la incertidumbre estándar:

Regla 1

Para modelos implicando solamente una suma o diferencia de cantidades, ej. $y = (p + q + r \dots)$, la incertidumbre estándar combinada $\mu_c(y)$ está dada por

$$\mu_c(y(p, q \dots)) = \sqrt{\mu(p)^2 + \mu(q)^2 + \dots}$$

Regla 2

Para modelos conllevando únicamente un producto o cociente, ej. $y = (p \times q \times r \times \dots)$ o $y = p/(q \times r \times \dots)$, la incertidumbre estándar combinada $\mu_c(y)$ está dada por

$$\mu_c(y) = y \sqrt{\left(\frac{\mu(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{\mu(q)}{q}\right)^2 + \dots}$$

donde $(\mu(p)/p)$ etc. son las incertidumbres en los parámetros, expresadas como desviaciones estándar relativas.

Descripción General del Método de Análisis para la Cuantificación de Hierro Total

► PRINCIPIO

La reacción entre el ion hierro (II) y la 1,10-fenantrolina (nombre común: ortofenantrolina) para formar un compuesto de color rojo-naranja es un buen método para determinar hierro (Day & Underwood, 1989).

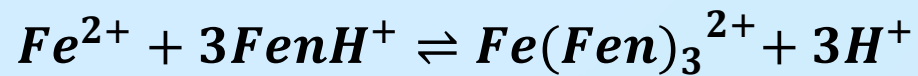
Reducción



Ajuste del pH

- Solución tampón: $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$

Complejación



HIPÓTESIS

El método colorimétrico de la ortofenantrolina es aplicable para la determinación de hierro total en el fruto de Cassia grandis L. f. previa destrucción del alto contenido de materia orgánica por calcinación seca y posterior disolución de las cenizas con ácido clorhídrico.

DISEÑO METODOLÓGICO

▶ TIPO DE ESTUDIO

- Tradicional
- Diseño experimental cuantitativo

▶ DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Cromatografía perteneciente al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua) en el período comprendido de Julio a Diciembre del 2012.

DISEÑO METODOLÓGICO

► POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN

Todos aquellos árboles de *Cassia grandis L. f.* que han alcanzado su estado de adultez bajo las condiciones edáficas y climáticas naturales eficientes para su hábitat en ciertas zonas geográficas del país.

MUESTRA

Por medio de un *muestreo simple aleatorio* se escogieron tres árboles de *Cassia grandis L. f.* del municipio de Tipitapa perteneciente al Departamento de Managua. De cada uno de éstos de igual forma se escogieron seis vainas.

DISEÑO METODOLÓGICO

► ¿QUÉ TAN REPRESENTATIVA ES LA MUESTRA?

Según el último Inventario Nacional Forestal (INF) 2007 – 2008 (INAFOR, 2009), el carao ocupa la novena posición de especies potencialmente comerciales y es considerado un árbol semillero con una frecuencia de 13 por cada 1,832 árboles semilleros lo que representa 0.71% de existencia.

Así,

$$R = \frac{n \times 100}{0.71} = \frac{3 \times 100}{0.71} \cong 423 \text{ árboles}$$

DISEÑO METODOLÓGICO

► VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Concentración de hierro total
- Incertidumbre de la concentración de hierro total

VARIABLES DEPENDIENTES

- Absorbancia

DISEÑO METODOLÓGICO

▶ OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variables	Definición operacional	Indicadores	Valores	Unidad de medida
Independiente				
Concentración de hierro total	La ecuación de la curva de calibración permite determinar la concentración de hierro total en el fruto de carao.	Ecuación de regresión de la Curva de calibración obtenida por MCO	0 – 1.4	Masa/masa mg Fe /100g de fruto
Incertidumbre de la concentración de hierro total	Tomando en cuenta todas las fuentes de incertidumbres de las variables que influyen en el cálculo de $[Fe]_m$ se puede estimar la incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de hierro total determinadas en las muestras de carao.	Incertidumbre estándar Incertidumbre estándar combinada Incertidumbre expandida	N. E.	Masa/masa mg Fe /100g de fruto
Dependiente				
Absorbancia	El método colorimétrico de la ortofenantrolina obedece la ley de Lambert y Beer por lo que puede prepararse una curva de calibración con estándares externos de concentraciones conocidas obteniendo las absorbancias correspondientes de cada una de éstas.	Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ201	0 – 1	Unidades de absorbancia u. a.

DISEÑO METODOLÓGICO

► MATERIALES Y MÉTODO

MATERIALES PARA RECOLECTAR INFORMACIÓN

- Fichas de artículos científicos
- Fichas de resumen
- Fichas de cita textual
- Matriz de síntesis
- Curvas de calibración
- Tarjetas de control para valores medios

DISEÑO METODOLÓGICO

► MATERIALES Y MÉTODO

MATERIALES PARA PROCESAR INFORMACIÓN

- Tablas
- Figuras
- Diagramas
- Mapas
- Gráficos
- Software ofimático, estadístico y de diseño gráfico
- Equipos de instrumentación analítica
- Materiales de laboratorio
- Reactivos grado ACS para análisis

DISEÑO METODOLÓGICO

► MATERIALES Y MÉTODO

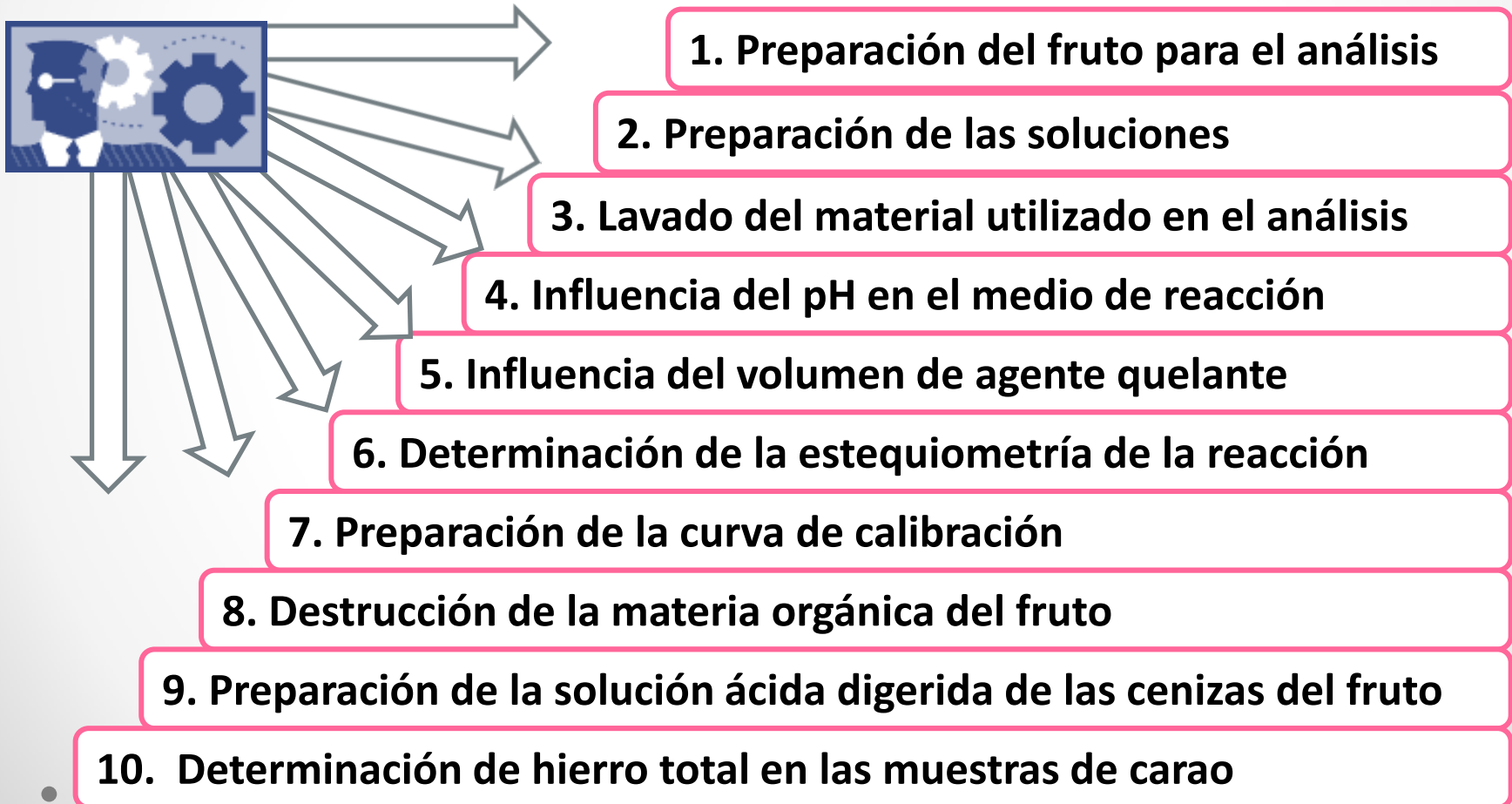
MÉTODO

- El método analítico es *cuantitativo*.
- Se utilizó como método de referencia el Método Oficial 944.02 Hierro en Harina (Iron in Flour) de los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2002).
- No obstante, se realizaron las adaptaciones pertinentes de este Método Oficial a la matriz del fruto de carao.

DISEÑO METODOLÓGICO

► MATERIALES Y MÉTODO

MÉTODO

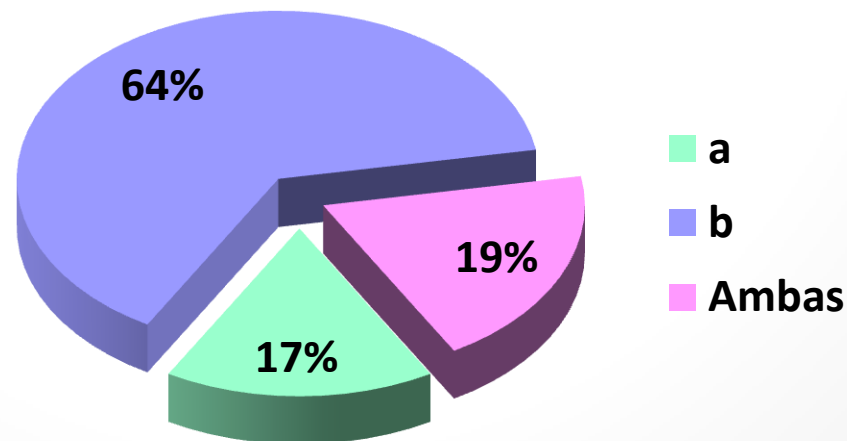


DISEÑO METODOLÓGICO

¿EN QUÉ FORMA SE UTILIZA EL FRUTO DE LA PLANTA DE CARAO?

Se aplicó una encuesta con la finalidad de conocer en qué forma utiliza la población nicaragüense el fruto del carao:

- a) Como miel de carao preparada a partir de un procedimiento casero.
- b) Directamente como pulpa una vez que es retirada de la vaina.
- c) Ambas formas.



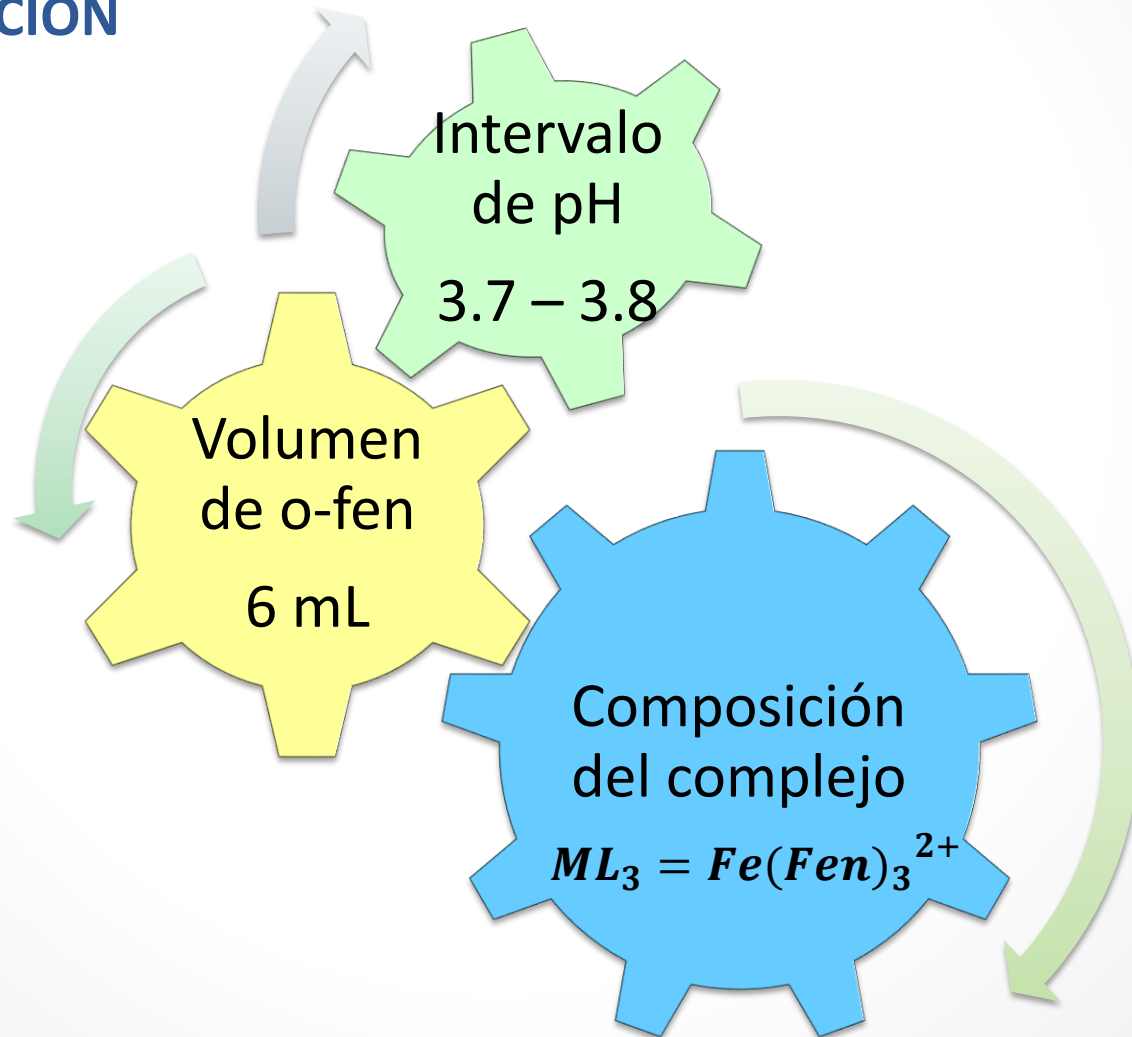
DISEÑO METODOLÓGICO

► PREPARACIÓN DEL FRUTO PARA EL ANÁLISIS



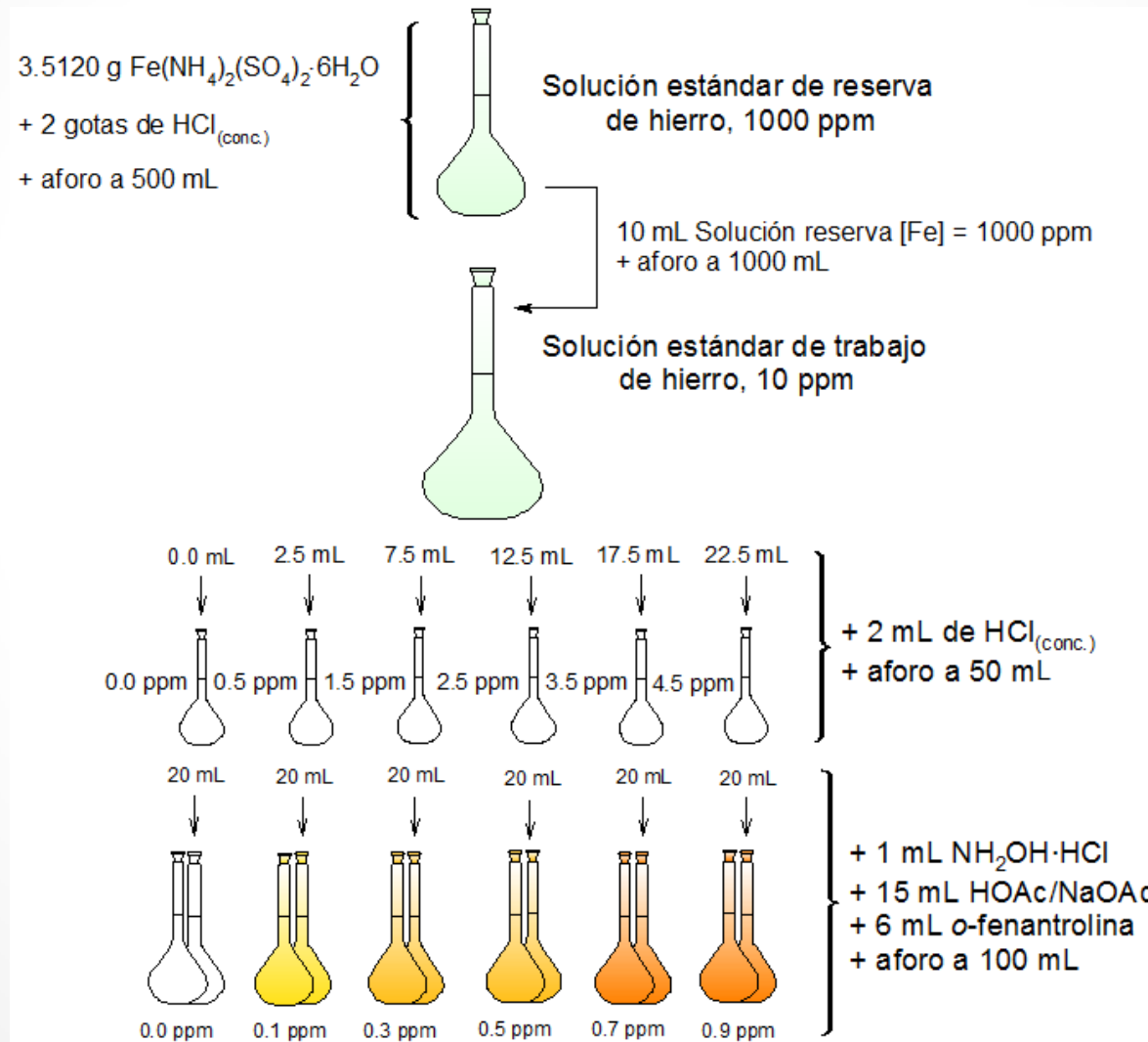
DISEÑO METODOLÓGICO

► CONSIDERACIONES PREVIAS EN LA PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN



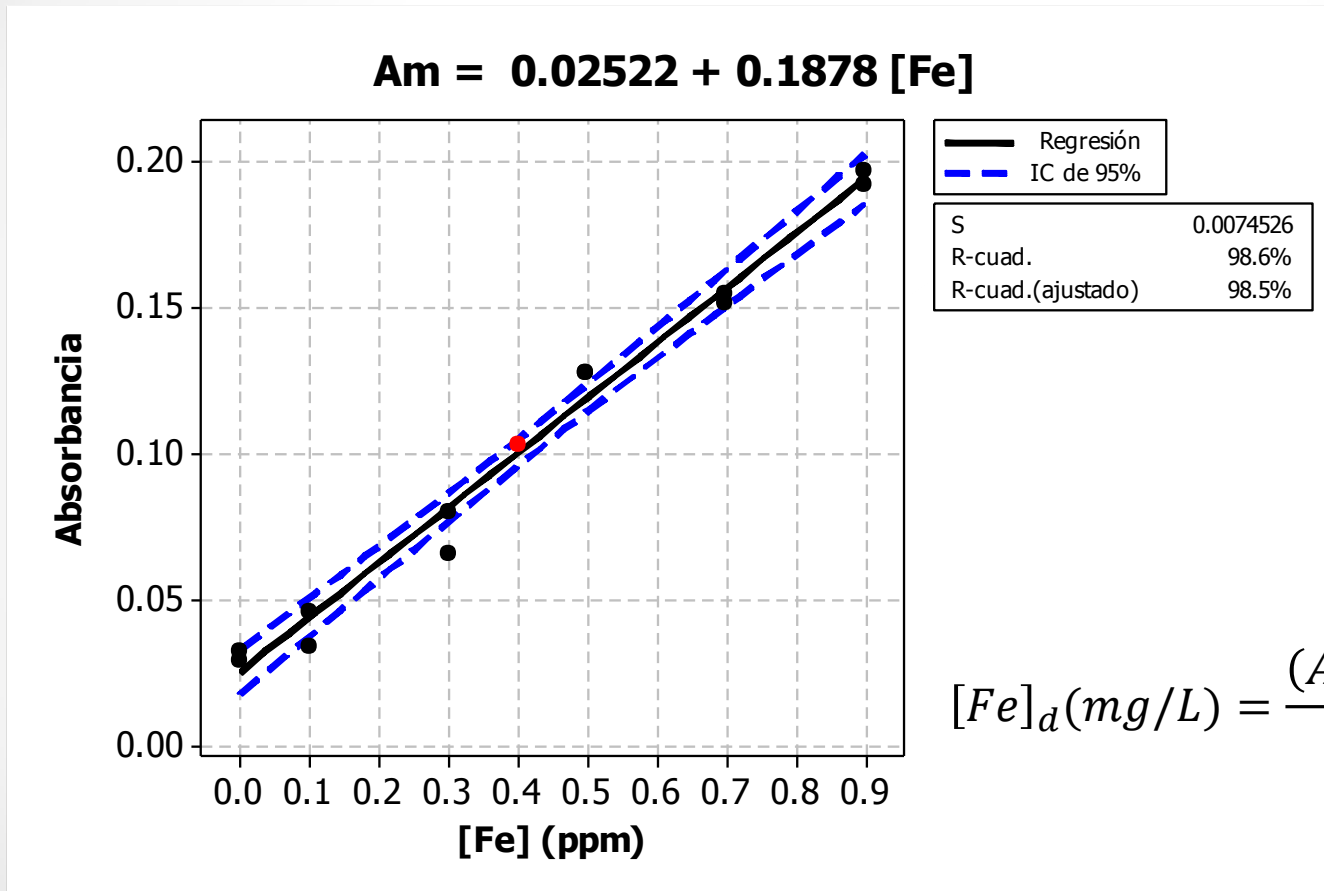
DISEÑO METODOLÓGICO

► PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN



RESULTADOS

▶ CURVA DE CALIBRACIÓN






$$A_c = A_m - A_b$$

$$[\text{Fe}]_d(\text{mg/L}) = \frac{(A_m - A_b) - 0.02522}{0.1878}$$

$$[\text{Fe}]_m \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{[\text{Fe}]_d(\text{mg/L}) \times V(\text{mL}) \times f}{m(\text{g})} \left(\frac{1}{100} \times 0.1 \right) \frac{\text{L}}{\text{mL}}$$

RESULTADOS

► DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL EN LAS MUESTRAS DE CARAO ANALIZADAS

N° de Árbol	Etiqueta del matraz	$[Fe]_m$ (mgFe/100g)	N° de Árbol	Etiqueta del matraz	$[Fe]_m$ (mgFe/100g)	N° de Árbol	Etiqueta del matraz	$[Fe]_m$ (mgFe/100g)
	mc/Fe1	1.83		mc/Fe1	1.91		mc/Fe1	1.95
	mc/Fe2	1.84		mc/Fe2	1.87		mc/Fe2	2.08
Árbol 1	1.1	0.76	Árbol 2	2.1	0.35	Árbol 3	3.1	0.44
	1.1/d	0.72		2.1/d	0.49		3.1/d	0.44
	1.2	0.64		2.2	0.99		3.2	0.46
	1.3	0.42		2.3	1.03		3.3	0.83
	1.3/d	0.54		2.3/d	0.41		3.4	0.28
	1.4	0.55		2.4	0.50		3.4/d	0.29
	1.5	0.18		2.4/d	0.68		3.5	0.26
	1.5/d	0.07		2.5	0.25		3.5/d	0.25
	1.6	0.65		2.6	0.65		3.6	0.48

$$\overline{[Fe]}_m = 0.51 \text{ mg/100g} \pm U$$

RESULTADOS

► INCERTIDUMBRE EXPANDIDA ASOCIADA AL RESULTADO FINAL PROMEDIO

$$\mu_c(\overline{[Fe]}_m) = \overline{[Fe]}_m \sqrt{\left(\frac{\mu(\overline{[Fe]}_d)}{\overline{[Fe]}_d}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_1)}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_3)}{V_3}\right)^2 + \left(\frac{\mu(\bar{m})}{\bar{m}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_2)}{V_2}\right)^2}$$

Variables cuyas incertidumbres estándar se asocian a $\mu_c(\overline{[Fe]}_m)$.

Variables	Incertidumbres estándar
$\overline{[Fe]}_m = 0.51 \text{ mgFe}/100g$	$\mu_c(\overline{[Fe]}_m) = ?$
$V_1 = 50 \text{ mL}$	$\mu(V_1) = 0.03170 \text{ mL}$
$V_2 = 40 \text{ mL}$	$\mu(V_2) = 0.03557 \text{ mL}$
$V_3 = 100 \text{ mL}$	$\mu(V_3) \approx 0.05217 \text{ mL}$
$\bar{m} = 10.0016 g$	$\mu(\bar{m}) = 0.00014 g$
$\overline{[Fe]}_d = 0.40 \text{ mg/L}$	$\mu(\overline{[Fe]}_d) = 0.019 \text{ mg/L}$

Fuente: Elaborado por el autor.

$$\mu_c(\overline{[Fe]}_m) = 0.51 \frac{\text{mgFe}}{100g} \sqrt{\left(\frac{0.019}{0.40}\right)^2 + \left(\frac{0.03170}{50}\right)^2 + \left(\frac{0.05217}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.00014}{10.0016}\right)^2 + \left(\frac{0.03557}{40}\right)^2}$$

RESULTADOS

► INCERTIDUMBRE EXPANDIDA ASOCIADA AL RESULTADO FINAL PROMEDIO

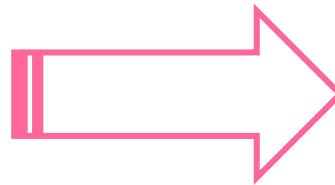
$$\mu_c(\overline{[Fe]}_m) = 0.51 \frac{mgFe}{100g} \sqrt{2.2577 \times 10^{-3}}$$

$$U = \mu_c(\overline{[Fe]}_m) \times k$$

$$\mu_c(\overline{[Fe]}_m) = 0.51 \frac{mgFe}{100g} \times 0.0475$$

$$U = 0.024 \frac{mgFe}{100g} \times 2.056$$

$$\mu_c(\overline{[Fe]}_m) = 0.024 \frac{mgFe}{100g}$$



$$U = 0.050 \frac{mgFe}{100g}$$

$$\overline{[Fe]}_m = (0.51 \pm 0.05) mg/100g^*$$

* La incertidumbre reportada es la incertidumbre expandida calculada utilizando un factor de cobertura de 2.056 el cual proporciona un nivel de confianza del 95%.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

▶ CURVA DE CALIBRACIÓN

▶ CONTRASTE “*t* DE STUDENT” PARA PROBAR UNA CORRELACIÓN SIGNIFICATIVA

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$t = \frac{|0.9930|\sqrt{12-2}}{\sqrt{1-(0.9930)^2}}$$

$$t = 26.59$$

Como el valor de t calculado es mayor que el valor de t tabulado a un nivel de confianza del 95% y 10 grados de libertad; se concluye que ***existe una correlación significativa en la curva de calibración.***

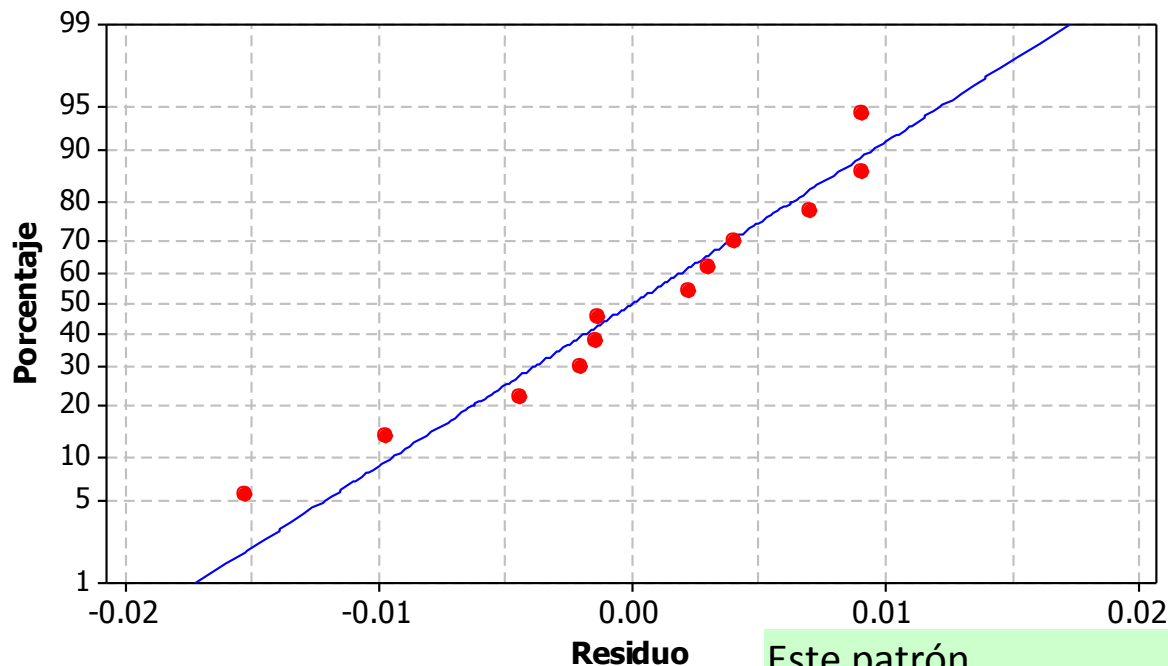
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

▶ CURVA DE CALIBRACIÓN

▶ PRUEBA DE NORMALIDAD, ASIMETRÍA Y VALORES ATÍPICOS DE LOS RESIDUOS DE LAS ABSORBANCIAS DE LOS ESTÁNDARES DE HIERRO

Gráfica de probabilidad normal de residuos

(la respuesta es Absorbancia)



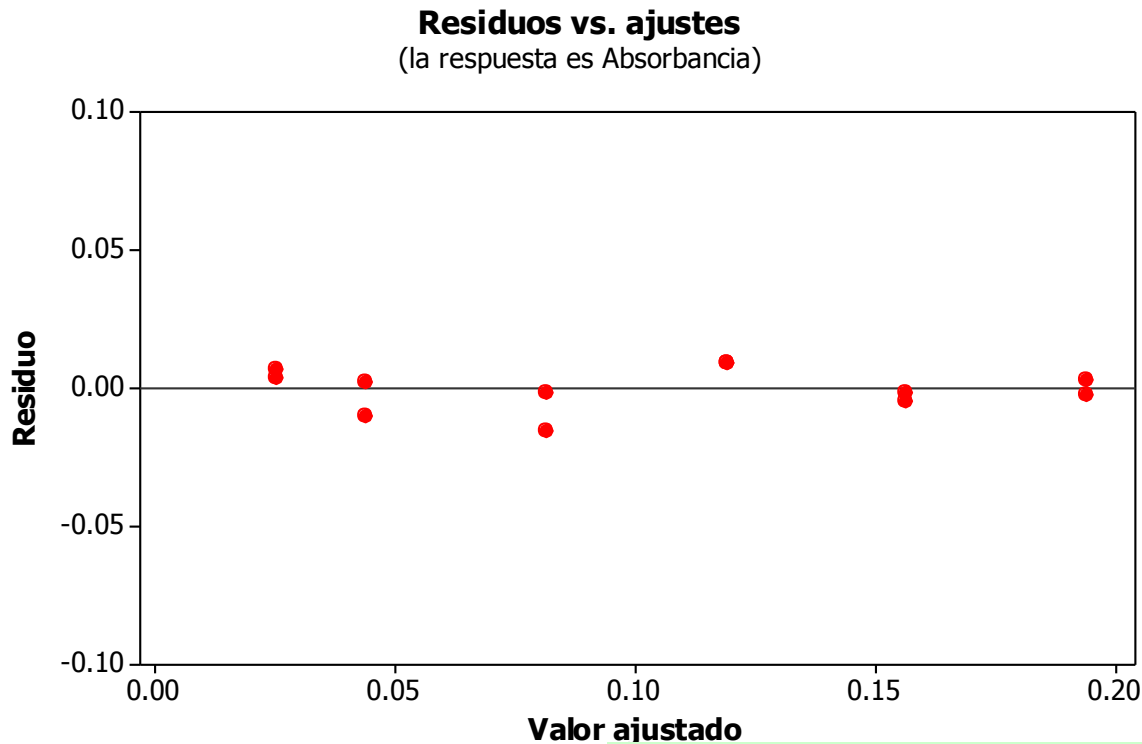
No existe evidencia de:

- *no normalidad,*
- *asimetría*
- *y valores atípicos.*

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

▶ CURVA DE CALIBRACIÓN

▶ PRUEBA DE VARIANZA NO CONSTANTE Y VALORES ATÍPICOS DE LOS RESIDUOS DE LAS ABSORBANCIAS DE LOS ESTÁNDARES DE HIERRO



Los residuos parecen estar dispersos aleatoriamente alrededor de cero.

No existe evidencia de:

- *varianza no constante*
- *y valores atípicos.*

Este patrón...

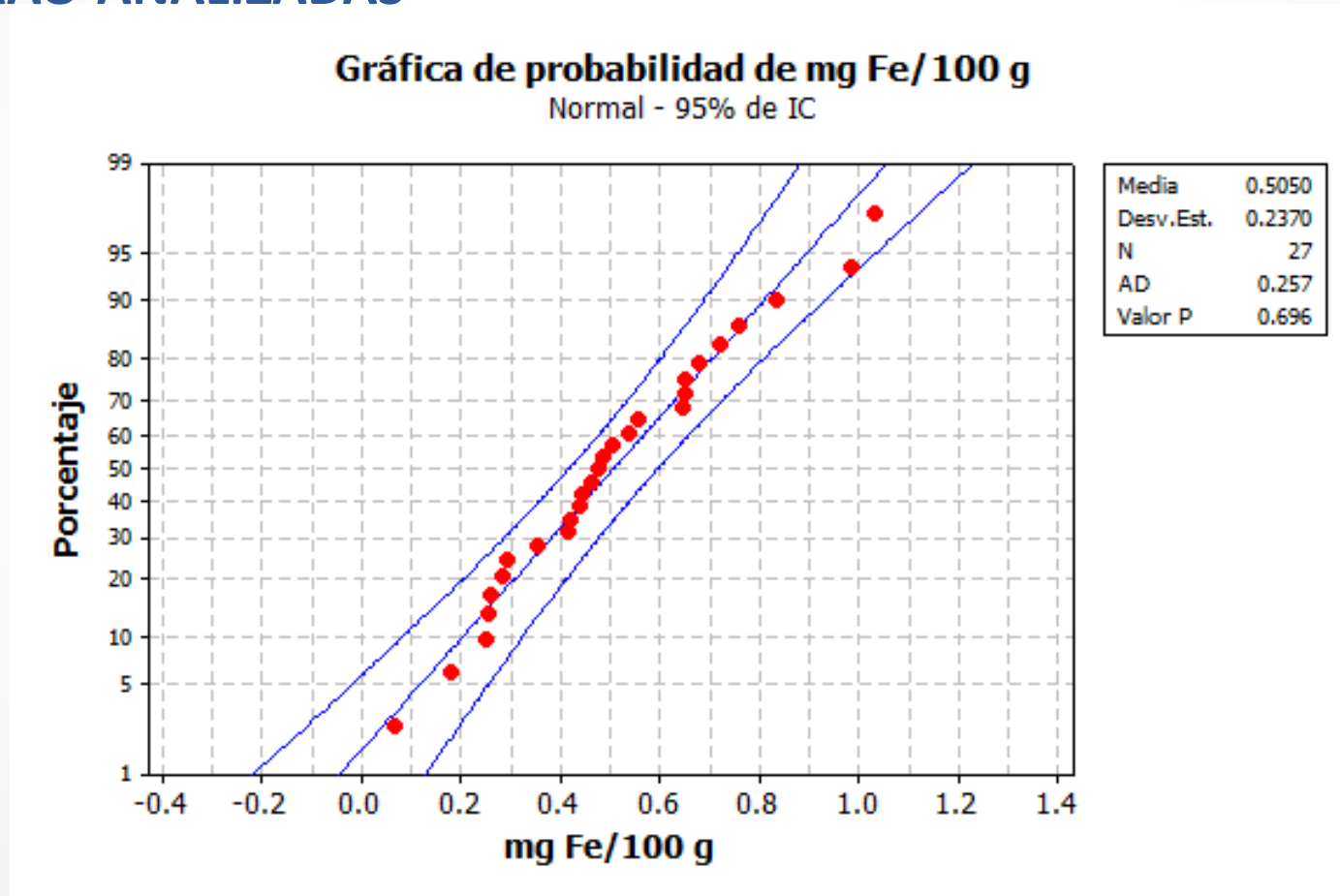
Dispersión en abanico o irregular de los residuos en los valores ajustados
Un punto alejado de cero

Indica...

Varianza no constante
Un valor atípico

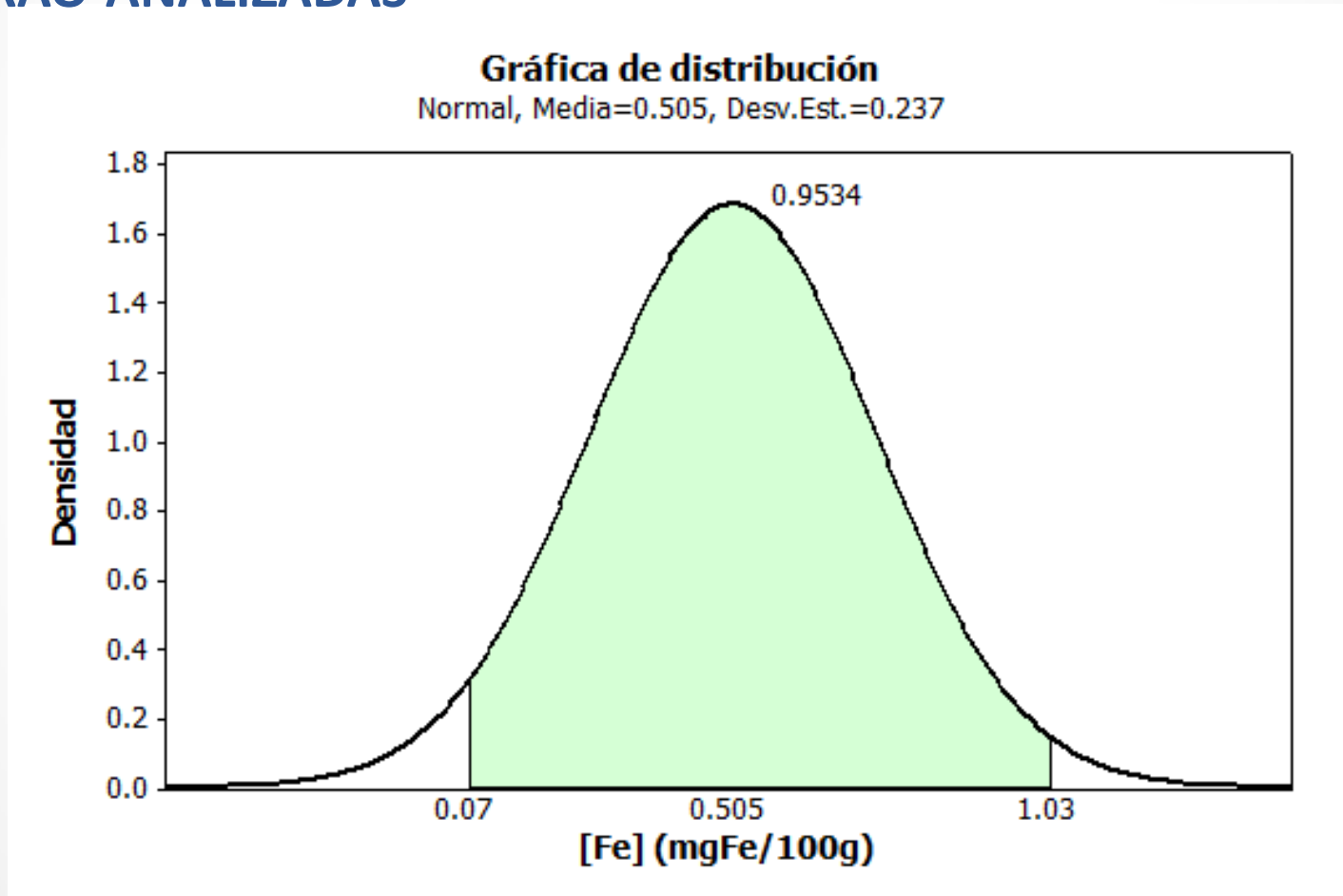
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

► DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL EN LAS MUESTRAS DE CARAO ANALIZADAS



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

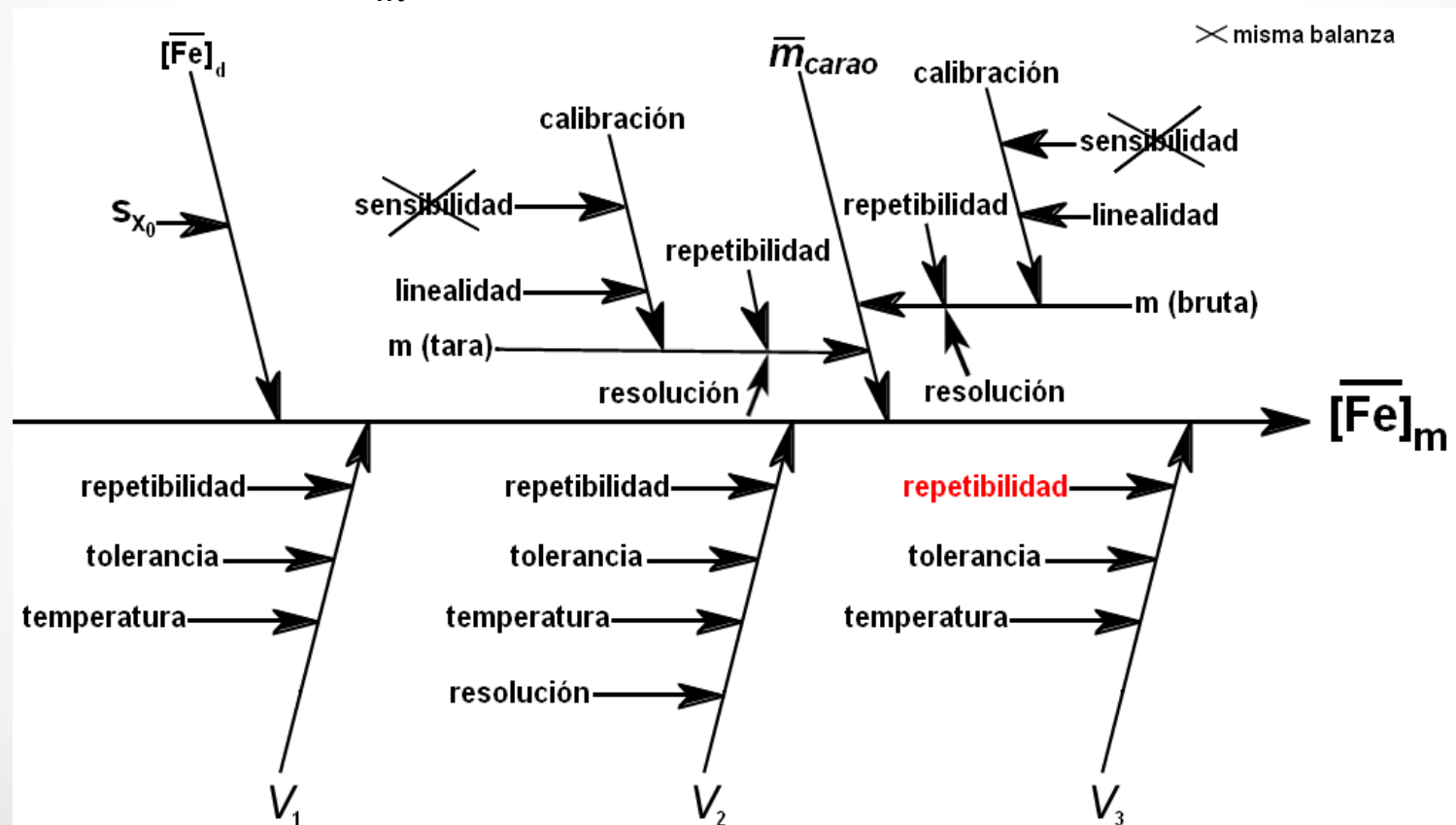
► DETERMINACIÓN DE HIERRO TOTAL EN LAS MUESTRAS DE CARAO ANALIZADAS



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

► INCERTIDUMBRE EXPANDIDA ASOCIADA AL RESULTADO FINAL PROMEDIO

Diagrama de causa y efecto para la estimación de la incertidumbre estándar combinada de $[\overline{Fe}]_m$.



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

▶ INCERTIDUMBRE EXPANDIDA ASOCIADA AL RESULTADO FINAL PROMEDIO

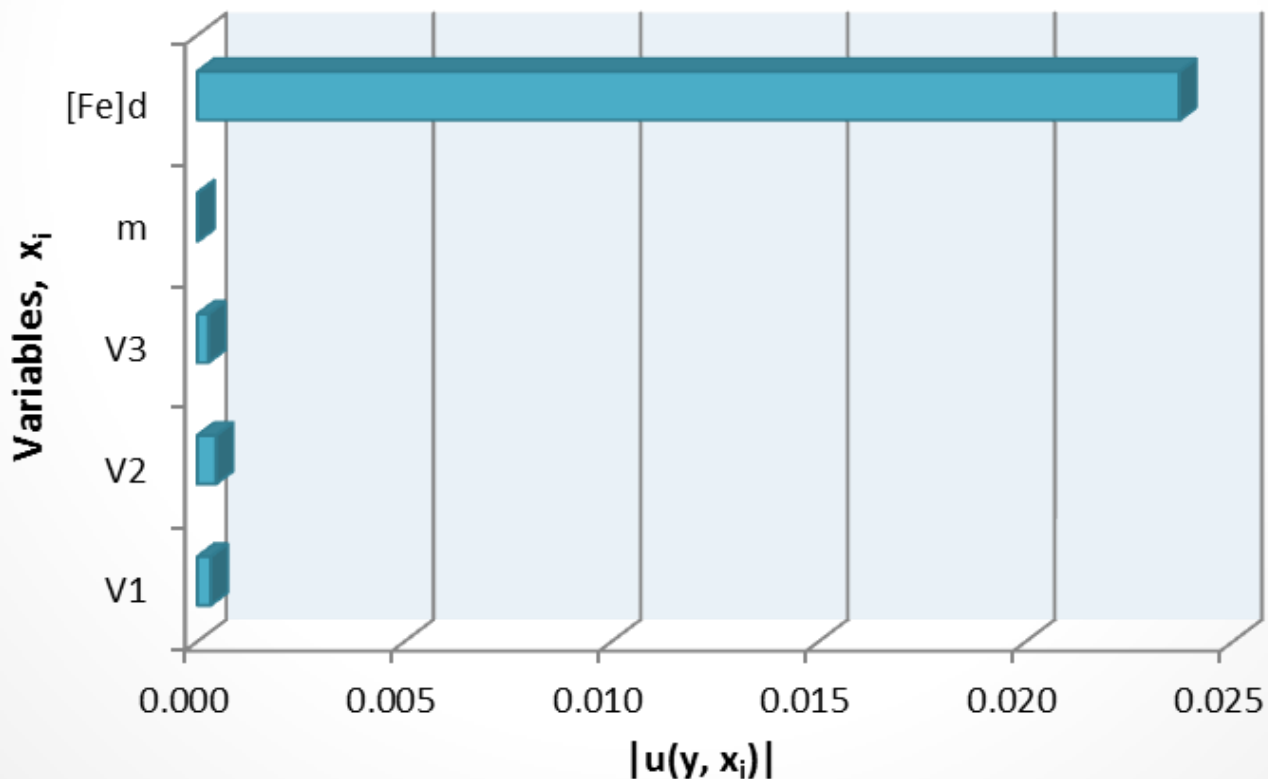
Aplicación del *Método de Kragten* para la estimación de la incertidumbre según la Guía QUAM:2012

	N	O	P	Q	R	S	T
1			V ₁	V ₂	V ₃	m	[Fe] _d
2		Valor	50	40	100	10.00162	0.40411
3		Incertidumbre	0.03170	0.03557	0.05217	0.00014	0.01897
4							
5	V ₁	50	50.03170	50	50	50	50
6	V ₂	40	40	40.03557	40	40	40
7	V ₃	100	100	100	100.05217	100	100
8	m	10.00162	10.00162	10.00162	10.00162	10.00176	10.00162
9	[Fe] _d	0.40411	0.40411	0.40411	0.40411	0.40411	0.42308
10							
11	[Fe] _m	0.50505	0.50537	0.50460	0.50531	0.50504	0.52876
12	u(y, x _i)*		0.00032	-0.00045	0.00026	-0.00001	0.02371
13	u(y) ² , u(y, x _i) ²	5.62E-04	1.025E-07	2.013E-07	6.941E-08	4.935E-11	5.62E-04
14							
15	u _c ([Fe] _m)	0.024					
16							
17	U([Fe])	0.05					
18							
19	* el signo de la diferencia ha sido retenido						

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

▶ INCERTIDUMBRE EXPANDIDA ASOCIADA AL RESULTADO FINAL PROMEDIO

Contribuciones de las incertidumbres estándar relativas en el cálculo de la incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de hierro total.



CONCLUSIONES

1. El análisis de la información obtenida a través de las encuestas muestra que la población nicaragüense utiliza directamente el fruto de *Cassia grandis L. f.* una vez que es extraído de la vaina. Por tal razón, la pulpa de carao fue definida como la matriz analito del estudio.
2. El alto contenido de materia orgánica presente en el fruto de *Cassia grandis L. f.* hace tediosa la determinación de las cenizas totales empleando el método de pretratamiento por combustión seca. No obstante, basándonos en los resultados obtenidos para las muestras control se puede concluir que el recobro de las cenizas totales por este método es mayor del 90%.

CONCLUSIONES

3. El método colorimétrico de la ortofenantrolina es apropiado para la cuantificación de hierro total en el fruto de *Cassia grandis L. f.* por espectrofotometría UV/Vis, pues una vez eliminado el contenido de materia orgánica, las únicas fuentes de interferencias podrían ser los minerales que constituyen la pulpa de carao, pero éstos no forman quelatos con el ligando bidentado 1,10-fenantrolina. Por lo que queda confirmada la hipótesis planteada.
4. La incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de hierro total determinadas en las muestras en estudio de *Cassia grandis L. f.* es un buen estimado de un intervalo cerrado, $0.46 \text{ mgFe}/100\text{g} - 0.56 \text{ mgFe}/100\text{g}$, dentro del cual se encuentra la “verdadera concentración promedio” de hierro total de las muestras analizadas en este estudio.

*Gracias por
su atención!!!*

*“Es mi convicción interna que el desarrollo de la ciencia
busca satisfacer el deseo del conocimiento puro”*

Albert Einstein