

Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura

TRABAJO DE GRADUACION

Implementación del método AOAC 968.08 y verificación de los parámetros de desempeño para la determinación de Cobre (Cu) en camarón.



Presentado por:

T. A. LOURDES MARÍA GÓMEZ ORELLANA

Para otorgarle el título de:

LICENCIADA EN ACUACULTURA

Guatemala, octubre del 2009

Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura

TRABAJO DE GRADUACION

Implementación del método AOAC 968.08 y verificación de los parámetros de desempeño para la determinación de Cobre (Cu) en camarón.



Presentado por:

T. A. LOURDES MARÍA GÓMEZ ORELLANA

Para otorgarle el título de:

LICENCIADA EN ACUACULTURA

Guatemala, octubre del 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA

CONSEJO DIRECTIVO

Presidente	M.Sc. Pedro Julio García Chacón
Coordinador Académico	M.Sc. Carlos Salvador Gordillo García
Secretaria y Representante Docente	M.Sc. Norma Edith Gil Rodas de Castillo
Representante del Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas	M.Sc. Estrella de Lourdes Marroquín Guerra

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala por permitirme desarrollar mis estudios de licenciatura.

Al Centro de Estudios del Mar y Acuicultura por ser el ente formador de mi carrera profesional como Acuicultora.

Al Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura por darme la oportunidad de desempeñar mi EPS en dicha institución, bríndame experiencias únicas en el campo de trabajo y por permitirme crecer profesionalmente.

Al Médico Veterinario Salomón Medina Paz y a la Licenciada Carolina Marroquín por su guía como futura profesional, por su colaboración y apoyo incondicional.

A la Licenciada Carmela Barrientos por su amistad, por su valioso tiempo y por su apoyo desmedido por ser más que una compañera una verdadera amiga.

A todas las personas que colaboraron conmigo en la realización de este informe, por su valioso tiempo, sus conocimientos, paciencia y amistad en todo momento.

ACTO QUE DEDICO

A Dios y a la Virgen María

Por ser mi fuente de inspiración, guía en los momentos difíciles, mi luz y mi todo.

A mis padres:

Guillermo Dario Gómez Ardón y Clara Stella Orellana Serrano, por brindarme todo el apoyo durante los años de mi carrera, siendo modelos en mi vida.

A mis hermanos:

José Arturo y José Alejandro por ser únicos en todo momento.

A Andrés Arrivillaga:

Por estar junto a mi en todo, por compartir su sabiduría y por ser incondicional.

A María Isabel Arrivillaga:

Por ser inspiración para ser mejor cada día.

A mis amigos y compañeros:

Por su amistad durante los años de mi carrera, por enseñarme que el éxito no solo se encuentra en un título si no más bien en el crecimiento integral.

RESUMEN

La investigación consistió en la implementación y verificación del método AOAC (por sus siglas en inglés Association of Official Agricultural Chemists) 968.08 para la determinación de Cobre (Cu) en el músculo de camarones utilizando el equipo de espectrofotometría de absorción atómica (AA) modelo AA6800 marca SHIMADZU bajo las condiciones específicas del Laboratorio de Sanidad Acuícola / Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA-.

Para la verificación del método se analizaron los siguientes parámetros de desempeño: exactitud, especificidad, límite de detección, linealidad y rango, a fin de que estos permitan al Centro de Estudios del Mar y Acuicultura brindar un servicio confiable.

El proyecto de investigación se trabajó en tres fases. En la primera etapa se realizó una recopilación teórica de información del equipo, se implementó el método y por último se documentó el proceso de implementación.

En la segunda etapa se realizó una serie de pruebas experimentales con el fin de implementar el método AOAC 968.08 permitiéndose así la obtención de la información acerca de los parámetros de desempeño del método con el equipo específico y las condiciones existentes en el laboratorio.

La tercera etapa se trabajó utilizando los resultados obtenidos al implementar el método y realizando las pruebas estadísticas permitieron determinar si se cumple con los criterios de aceptación de métodos propuestos por la Oficina Guatemalteca de Acreditación -OGA- en el 2007.

La investigación dio como resultado que el método planteado cumple con los parámetros de desempeño de: exactitud, especificidad, límite de detección, linealidad y rango, demostrando que éste puede ser utilizado en el Laboratorio de Sanidad Acuícola de CEMA.

ABSTRACT

The investigation consisted in verify and implement the AOAC 968.08 method for the determination of copper (Cu) in shrimp muscles using a SHIMADZU AA6800 atomic absorption spectrophotometer (AA), under the conditions of the Aquiculture Sanity Laboratory in CEMA (Centro de Estudios del Mar y Acuicultura).

To verify the method the following parameters were analyzed: exactness, specificity, detection limit, line precision and range. This analysis was made in order to have a reliable service.

The investigation project was developed in three phases. In the first phase a literature research for the functions of the apparatus took place, the method was implemented and last the documentation process.

The second phase was the experiment try outs to obtain information about the parameters that apply to the specific apparatus in the laboratory and the existing conditions to implement the method.

In the third phase the results from the first and second phases, were used in a statistics method to establish the acceptance of the methods proposed by the OGA (Oficina Guatemalteca de Acreditación)

The result of the research was that the proposed method has the following approved parameters: exactness, specificity, detection limit, line precision and range proving that it can be used in the Aquiculture Sanity Laboratory in CEMA.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACION	2
III. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Fuente de cobre	3
3.2 Efectos ambientales del cobre	3
3.3 Toxicidad del cobre en humanos	5
3.4 Toxicidad del cobre en organismos acuáticos	6
3.5 Determinación de cobre por espectrofotometría de absorción atómica	7
3.6 Implementación y verificación de métodos	9
3.7 Parámetros de desempeño	10
3.7.1 <i>Exactitud</i>	10
3.7.2 <i>Especificidad</i>	11
3.7.3 <i>Limite de detección</i>	11
3.7.4 <i>Linealidad</i>	12
3.7.5 <i>Rango</i>	13
IV. OBJETIVOS	14
4.1 General	14
4.2 Específicos	14
V. METODOLOGIA	15
5.1 Descripción del área	15
5.2 Variables de evaluación	18
5.3 Análisis e interpretación de resultados	19
5.3.1 <i>Exactitud</i>	19
5.3.2 <i>Especificidad</i>	22
5.3.3 <i>Limite de detección</i>	22
5.3.4 <i>Linealidad</i>	24
5.3.5 <i>Rango</i>	27
5.4 Recolección de la información	27
VI. PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
6.1 Evaluación de exactitud	28

6.2 Evaluación de especificidad	30
6.3 Evaluación de límite de detección	31
6.4 Evaluación de linealidad	33
6.5 Evaluación de rango	36
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. RECOMENDACIONES	38
IX. BIBLIOGRAFIA	39
X. ANEXO	42

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura No. 1.	Absorción de luz	8
Figura No. 2.	Excitación de los átomos	9
Figura No. 3.	Límite de detección y parámetro de decisión de un analito	12
Figura No. 4.	Ubicación de CEMA dentro del campus universitario	15
Figura No. 5.	Laboratorio de Sanidad Acuícola	16
Figura No. 6.	Equipo de Absorción Atómica, Espectrofotómetro de CEMA	17
Figura No. 7.	Curva de calibración	19
Figura No. 8.	Corrida de estándares como muestra	20
Figura No. 9.	Corrida de blancos como muestra	23
Figura No. 10.	Corrida de concentración de blancos como muestra	24
Figura No. 11.	Curva de calibración	25
Figura No. 12.	Curva de ecuación lineal de los promedios	26
Figura No. 13.	Linealidad del método	26
Figura No. 14.	Porcentaje recuperación para las distintas concentraciones	29
Figura No. 15.	Límite de detección (3 desviaciones estándares de la media de blancos)	32
Figura No. 16.	Linealidad para las distintas concentraciones	34
Figura No. 17.	Razón de respuesta para las concentraciones teóricas	35

INDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro No. 1.	Equipo de Absorción Atómica AA	16
Cuadro No. 2.	Inventario auxiliar de AA	17
Cuadro No. 3.	Cristalería para AA	18
Cuadro No. 4.	Reactivos para AA	18
Cuadro No. 5.	Colecta y análisis estadístico del parámetro de desempeño exactitud	21
Cuadro No. 6.	Colecta de información de la concentración de los blancos leídos como muestra	23
Cuadro No. 7.	Colecta de la concentración de los blancos leídos como muestra	25
Cuadro No. 8.	Curva de calibración para cada día de trabajo	28
Cuadro No. 9.	Evaluación de exactitud	28
Cuadro No. 10	Condiciones de operación para la determinación de Cu utilizando el equipo SHIMADZU AA6800	30
Cuadro No. 11.	Evaluación de lectura de blancos	31
Cuadro No. 12.	Estadísticos límite de detección	32
Cuadro No. 13.	Linealidad	33
Cuadro No. 14.	Razón de respuesta promedio para las distintas concentraciones	34

I. INTRODUCCION

Al ser el cobre un metal pesado de importancia en el sector hidrobiológico del país, es necesaria la implementación de análisis de laboratorio que permitan la determinación y cuantificación de este elemento en distintas matrices. En este caso se implementó y se verificó el método AOAC 968.08 (Minerals in animals in feed and pet food; atomic absorption spectrophotometric method) que permite establecer la presencia y cuantificar este elemento en camarones.

A fin de implementar el método se recolectó información con respecto al equipo, la matriz de análisis y el elemento a estudiar; permitiéndose de esta manera establecer que el método AOAC 968.08 cumple con las condiciones del Laboratorio de Sanidad Acuicola de CEMA para ser implementado. A su vez el método fue verificado, proceso que consistió en la realización de evaluaciones con el equipo de absorción atómica (AA6800 SHIMADZU) lográndose de esta manera estudiar los parámetros de desempeño exactitud, especificidad, límite de detección, linealidad y rango.

El documento contiene a detalle los resultados de cada uno de los estudios de evaluación de los parámetros de desempeño del método así como el contraste comparativo con los criterios de aceptación de la OGA.

Se estableció que la implementación de metodologías estándares y la verificación de métodos son herramientas de suma importancia en los laboratorios de análisis pues es por medio de este proceso que se da validez y se puede garantizar la certeza de los resultados de un análisis.

El estudio permitió concluir que el Laboratorio de Sanidad Acuicola del CEMA cumple con todos los requerimientos de equipo, insumos y condiciones necesarias para la implementación del método AOAC 968.08 (Minerals in animals in feed and pet food; atomic absorption spectrophotometric method), así también que los parámetros de desempeño exactitud, especificidad, límite de detección, linealidad y rango se encuentran dentro de los criterios de aceptación que establece la OGA para los laboratorios de análisis.

II. JUSTIFICACION

Debido a que el Cobre (Cu) es un metal pesado que tiene un alto potencial de toxicidad y es bioacumulable en los organismos acuáticos y en el ser humano, es necesaria la determinación y cuantificación del mismo. Ya que los camarones son organismos acuáticos para el consumo humano, es importante para el mercado nacional e internacional que los productos cuenten con certificados de análisis confiables y certeros de elementos residuales.

La etapa de verificación consiste en examinar un método normalizado, en este caso el método AOAC 968.08 para determinar su conformidad con el uso previsto. Para ello es necesario evaluar las características o parámetros de desempeño, las cuales permiten garantizar que el método desarrollado cumple con los criterios de aceptación planteados por OGA, entidad que evalúa, acredita y valida los métodos de laboratorio en el país. El cumplir con los criterios de aceptación garantiza que el método es capaz de evaluar un analito según las condiciones, características y procesos específicos del laboratorio.

El Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA- cuenta con equipo altamente tecnificado para la determinación de metales pesados, por lo que la implementación y verificación de metodologías específicas se vuelve relevante, de esta manera el centro garantiza que los proyectos de investigación y servicios que este pueda prestar se encuentran dentro de los criterios de aceptación de la autoridad competente en el país.

Por lo anterior surge la necesidad de evaluar los parámetros de desempeño del método espectrofotométrico por absorción atómica AOAC 968.08, siendo este el método aceptado internacionalmente para la determinación cobre en alimentos.

A corto plazo la evaluación de los parámetros de desempeño permite agilizar el proceso de implementación y verificación del método. A mediano plazo se espera documentar la capacidad y garantizar que el método utilizado por el laboratorio es apto para el propósito que fue diseñado. A largo plazo la evaluación de los parámetros de desempeño permiten que el Laboratorio de Sanidad Acuicola, como parte integral del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, preste servicios confiables en la determinación y cuantificación de Cobre (Cu) en el músculo de camarón.

III. MARCO TEORICO

3.1 Fuentes de Cobre

El Cobre se encuentra en diferentes estados en la naturaleza. Puede adquirirse en el ambiente, pues este es liberado por la industria minera, actividades agrícolas y de manufactura, y por la liberación de aguas residuales a ríos y lagos, también es liberado desde fuentes naturales como por ejemplo volcanes, polvo que sopla el viento, vegetación en descomposición e incendios forestales. Este elemento liberado al ambiente generalmente se adhiere a partículas de materia orgánica, arcilla, tierra o arena (CESCO, 1994).

El Cobre no se degrada en el medio ambiente. Los compuestos de este mineral pueden liberarse al aire, el agua o los alimentos. En el ser humano se puede adquirir por respirar aire, tomar agua, comer alimentos, o por contacto de la piel.

El agua potable puede tener niveles altos de Cu si se conduce por cañerías de este material así como agua con alta acidez. Los lagos y ríos que han sido tratados con compuestos de Cobre para controlar algas o que reciben agua de refrigeración de plantas de energía pueden tener altas concentraciones del mismo. Los suelos también pueden tener niveles altos de este mineral, especialmente cerca de fundiciones de este metal. Se puede estar expuesto al Cu si se ingieren fungicidas que lo contienen, o si vive cerca de una mina, así como puede estar expuesto si se trabaja con metales que contienen el elemento (CESCO, 1994).

3.2 Efectos ambientales del Cobre

La producción mundial está todavía creciendo. Esto básicamente significa que más y más Cobre termina en el medioambiente. Los ríos están depositando barro en sus orillas que están contaminados con Cu, debido al vertido de aguas residuales contaminadas. Este elemento entra en el aire, mayoritariamente a través de la liberación durante la combustión de diesel permaneciendo por un período de tiempo eminente, antes de depositarse cuando empieza a llover. Este terminará mayormente

en los suelos, como resultado, los suelos pueden también contener grandes cantidades de Cobre después de que éste sea depositado desde el aire (World Copper Factbook, 2007).

El Cobre puede ser liberado en el medioambiente tanto por actividades humanas como por procesos naturales. Ejemplo de fuentes naturales son las tormentas de polvo, descomposición de la vegetación, incendios forestales y aerosoles marinos, ejemplos de actividades humanas que contribuyen a la liberación del cobre han sido ya nombrados. Otros ejemplos son la minería, la producción de metal, la producción de madera y la producción de fertilizantes fosfatados (Solem, 1984).

El Cobre es a menudo encontrado cerca de minas, asentamientos industriales, vertederos y lugares de residuos (Michael, 1992).

Cuando este metal termina en el suelo este es fuertemente atado a la materia orgánica y minerales. Como resultado éste no viaja muy lejos antes de ser liberado y es difícil que entre en el agua subterránea. En el agua superficial el Cobre puede viajar largas distancias, tanto suspendido sobre las partículas de lodos como iones libres (Coca; Rosique, 2000).

El Cobre no se rompe en el ambiente y por eso se puede acumular en plantas y animales cuando este es encontrado en suelos sólo un número pequeño de plantas puede vivir. Por esta razón no hay diversidad de plantas cerca de las fábricas de Cobre. Debido al efecto del elemento sobre las plantas. Este mineral puede seriamente influir en el proceso de ciertas tierras agrícolas, dependiendo de la acidez del suelo y la presencia de materia orgánica. A pesar de esto el estiércol que contiene cobre es todavía usado (Michael, 1992).

Puede interrumpir la actividad en el suelo, su influencia negativa en la actividad de microorganismos y lombrices de tierra. La descomposición de la materia orgánica puede disminuir debido a esto (Coca; Rosique, 2000).

Cuando los suelos de las granjas están contaminados con Cobre, los animales pueden absorber concentraciones que dañan su salud. Principalmente las ovejas

sufren un gran efecto por envenenamiento con cobre, debido a que los efectos se manifiestan a bajas concentraciones (Michael, 1992).

3.3 Toxicidad del Cobre en humanos

El Cobre es un elemento esencial para la salud del cuerpo humano en concentraciones normales (no alteradas en la cadena alimenticia); a diferencia de otros elementos esenciales, es una sustancia que en altas concentraciones puede ser tóxico. Se debe tener un equilibrio, porque si se acumulan ciertas cantidades de Cobre pudiera resultar tóxico y si se carece de este elemento esencial se pueden presentar consecuencias negativas en la salud. Existen personas que pueden ingerir elevadas cantidades de cobre a lo largo de su ciclo vital y una vez que se satisfacen las necesidades que el organismo requiere, el Cobre puede acumularse en diferentes órganos y tejidos, y es entonces cuando empieza a presentar efectos crónicos tóxicos. Por ejemplo, demasiado Cobre en la sangre ha sido asociado con infecciones frecuentes, náuseas, dolores de cabeza, enfermedades hepáticas, leucemia, ataques cardíacos y artritis reumatoide (Hochleitner 1994).

Las consecuencias de la alta acumulación de Cobre en el tejido hacen que se presenten activación de enzimas y destrucción de membranas, lo cual puede causar mutaciones del ADN, cirrosis hepática o enfermedades hereditarias como el mal de Wilson y Menkes, que ocasiona la retención de cantidades excesivas de Cobre en el hígado; la acumulación de cobre en el sistema nervioso central produce daño neurológico y en algunos aspectos tiene cierto parecido con la enfermedad de Parkinson, la cual puede acompañarse de manifestaciones siquiátricas, y la aparición en la córnea de un anillo parduzco pericorneal (anillo Kayser-Fleisher) (Hochleitner, 1994).

Artículos científicos indican una unión entre exposiciones de largo término a elevadas concentraciones de Cobre y una disminución de la inteligencia en adolescentes.

Recomendaciones para prevenir la presencia de altas concentraciones de Cobre en los seres humanos son: evitar los alimentos como hígado, que tienen alta concentración de Cobre (3 mg en 120 gr); no utilizar la primera agua del día para

beber, ya que las tuberías son de Cobre y si el agua se queda depositada ahí toda la noche va a tener un contenido muy alto de este elemento, por lo que se sugiere dejar pasar el agua por 2 minutos antes de ingerirla (Hochleitner 1994).

En los últimos años la Organización Mundial de la Salud (1998) ha presentado al Cobre provisionalmente en el listado de los elementos que pueden causar daños a la salud humana; por su parte, la Unión Europea lo ha incluido por primera vez en un listado similar y el estado de California, en Estados Unidos, ha establecido un nuevo límite máximo para el cobre en agua potable muy por de bajo de la norma de la OMS y de la Agencia de Protección al Medio Ambiente de Estados Unidos de América (USEPA); reduciendo el uso del Cobre para cañerías y facilitando la aplicación de materiales alternativos (Hochleitner 1994).

3.4 Toxicidad del cobre en organismos acuáticos

Los metales, incluyendo los micronutrientes esenciales, son tóxicos para los organismos acuáticos y para los seres humanos si los niveles de exposición son suficientemente altos (Laws, 1981).

El Cobre se halla en forma natural en el agua de mar en concentraciones bajas, alrededor de dos microgramos por litro o partes por billón. En el agua de los ríos, la concentración es mayor, aproximadamente siete microgramos por litro.

A través del proceso de concentración biológica, el Cobre es bioacumulado por los organismos vivos filtradores, alcanzando elevadas concentraciones en macroinvertebrados. La asimilación implica la formación de complejos con sustancias orgánicas, las cuales no son fácilmente eliminadas por la excreción.

La mayor concentración de cobre en los crustáceos decápodos se encuentra en el hepatopáncreas y en la sangre, donde forma parte del pigmento respiratorio o hemocianina. El sulfato de Cobre, es un alguicida, de uso generalizado en acuicultura, tanto para el control de la vegetación acuática indeseable como en la inducción de la muda en los camarones y langostinos adultos. La toxicidad aguda del

cobre difiere grandemente de acuerdo al nivel trófico del organismo y al estadio de su ciclo de vida.

Por el papel que juegan los metales como activadores de numerosas enzimas para el metabolismo. El Cobre y Zinc son encontrados en el músculo y la glándula digestiva de los crustáceos decápodos, donde ocurre una bioacumulación o un alojamiento de metales en el organismo.

Aunque los organismos vivos requieren de ciertas cantidades de iones metálicos para realizar eficazmente los procesos fisiológicos, un exceso de iones de metales pesados producen estrés que se manifiesta en forma subletal o causa la muerte. Los organismos marinos han desarrollado un número variado de estrategias adaptativas que son denominadas colectivamente como “metabolismo de los metales” e incluyen la regulación activa de la absorción del metal, la distribución, el metabolismo y la excreción (Scelzo, 1997).

3.5 Determinación de cobre por espectrofotometría de absorción atómica

La espectrofotometría es el método de análisis instrumental más usado en las investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (Rottman, 2003).

En la espectrofotometría atómica se espera que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética. Las técnicas empleadas en este tipo de análisis requieren de un dispositivo que permita convertir los componentes de una muestra al estado atómico (Rottman, 2003).

La atomización de la muestra se logra colocándola bajo condiciones bastante energéticas, los métodos más ampliamente utilizados son la llama y el horno de grafito. Los elementos no metálicos presentan inconvenientes para su determinación por este procedimiento ya que se atomizan y llegan a ionizarse a temperaturas bajas. Cada uno de los diferentes elementos metálicos tiene un conjunto de niveles

energéticos a los cuales se puede excitar estando como átomo en fase gaseosa (Rottman, 2003).

Cuando la radiación electromagnética incide sobre una muestra translúcida hay una pequeña porción que se refleja en la entrada a la muestra, por lo tanto la intensidad de la radiación que atraviesa la muestra es inferior a la que venía de la fuente. Dentro de la muestra se produce la absorción es decir que la intensidad con la que ingresa se ve reducida al llegar a la salida del haz de radiación (Figura No. 1) (Cole-Parmer, 2000).

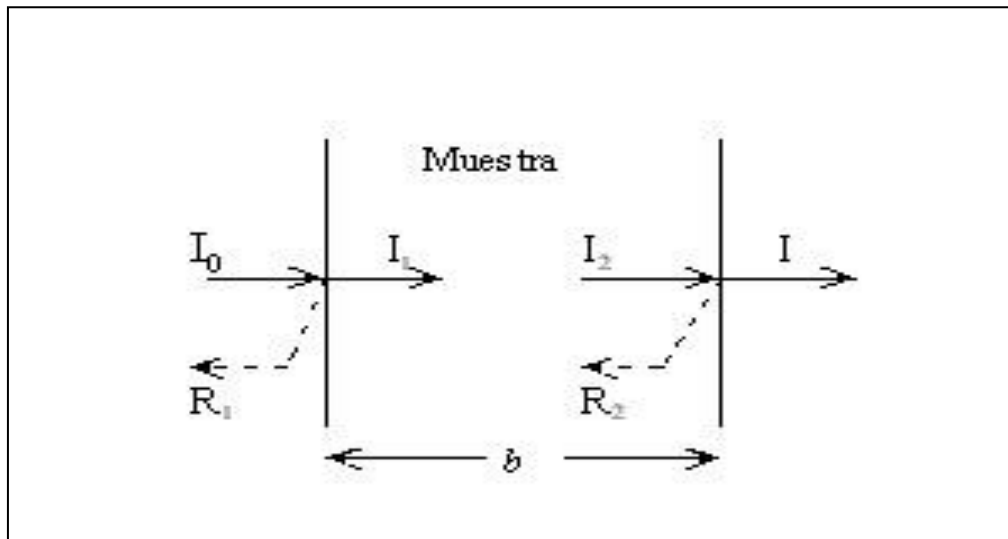


Figura No. 1. Absorción de luz (Rottman, 2003).

Cierta parte de la radiación la absorbe la muestra. La transmitancia interna es la relación entre la intensidad de la radiación en el extremo de salida de la muestra y la que tiene al ingresar a la misma, esta es una relación exponencial con la capacidad de absorción que tiene la muestra y la distancia que atraviesa el haz en la muestra es una propiedad de la muestra denominada coeficiente de absorción. Una pequeña parte de la radiación se refleja y eventualmente sale de la muestra en dirección de la fuente de radiación (Cole-Parmer, 2000).

Se presenta una situación probable de niveles energéticos en un átomo (Figura No. 2).

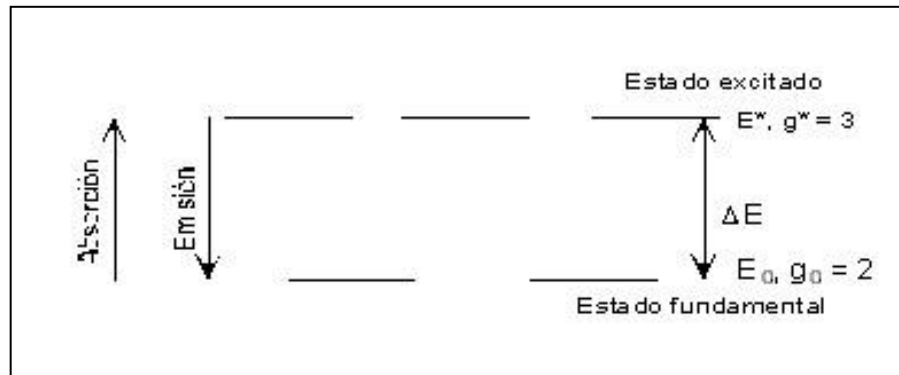


Figura No. 2. Excitación de los átomos (Rottman, 2003).

Cuando se realiza la atomización en la llama, la población de átomos en su estado fundamental debe ser lo suficientemente alta para permitir la absorción de radiación que los lleva a nivel excitado. Si la temperatura es muy alta la población de átomos en el nivel excitado será muy grande y por lo tanto no podrá absorber la radiación incidente (Cole-Parmer, 2000).

3.6 Implementación y verificación de métodos

La implementación de métodos se refiere a poner en práctica una serie de procedimientos para realizar el estudio de un determinado analito. La implementación de un método puede ser de un método no normalizado, normalizado o desarrollado por el laboratorio. En el caso de los métodos normalizados la implementación corresponde a la utilización de los procedimientos descritos en un método internacional como lo son los métodos AOAC.

Para la implementación y verificación de un método categoría I (método analítico para cuantificar componentes trazas y activos de residuos o contaminantes) es necesario que se evalúen los siguientes parámetros de desempeño: exactitud, precisión, especificidad, linealidad, límite de detección, rango y robustez (Bloom, 2008).

El laboratorio que va a utilizar un método normalizado debe verificarlo contra sus especificaciones de validación, atendiendo los requisitos para el aseguramiento de la

calidad, y no necesita validarlo. Esta verificación permite mostrar que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente. En la mayoría de casos se puede considerar que el desarrollo de los métodos normalizados se han tenido en cuenta todos los aspectos necesarios relativos a su validación (OGA, 2007).

Al presentarse el caso de no haber evidencia suficiente para deducir que se ha llevado a cabo una correcta validación, el laboratorio usuario deberá definir un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del método (OGA, 2007).

3.7 Parámetros de desempeño

Los parámetros de desempeño son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen exactitud, exactitud relativa, desviación, desviación positiva, desviación negativa, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez y fortaleza así como otras características relacionadas con los resultados obtenibles por el método (OGA, 2007).

3.7.1 *Exactitud*

La exactitud se refiere a la proximidad de los valores medios al valor real, puede entonces representarse como el porcentaje de recuperación o valor de recobro. Las impurezas pueden demostrar la exactitud a través del “spiking” de las muestras. Para una sustancia el método es exacto cuando se demuestra una especificidad alta, linealidad, precisión y robustez. La exactitud se establece al demostrar un buen recobro del producto final (Bloom, 2008).

Para la estadística de química analítica la exactitud se refiere a la respuesta de la pregunta ¿Hasta qué punto se aproxima el resultado al verdadero valor de la concentración o cantidad que se puede medir? La Organización Internacional de estándares (ISO) define a la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado del analito. En resumen se

puede decir que la exactitud mide la proximidad de un valor experimental a un valor verdadero (Miller, 2002).

El procedimiento para determinar el porcentaje de recuperación se plantea según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = (\text{Valor experimental} / \text{Valor teórico}) \times 100$$

Para que la exactitud cumpla con el criterio de aceptación el porcentaje de recuperación debe estar entre el noventa y ciento diez por ciento. Los porcentajes de recuperación menores pueden ser aceptables basados en la necesidad del método (OGA, 2007).

3.7.2 Especificidad

La especificidad es también conocida como la selectividad del método y se refiere a la habilidad que tiene el método para determinar de forma inequívoca, la presencia del analito de interés por sobre componentes que puedan estar presentes como impurezas, degradantes, matrices y otros. La evaluación del parámetro de desempeño de especificidad se realiza en ensayos de: identificación, cuantificación y pruebas de impurezas (Bloom, 2008).

3.7.3 Límite de detección

En términos generales el límite de detección “LOD” de un analito se describe como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento, significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. La determinación del LOD proporciona al analista un buen margen de libertad para decidir la definición exacta del límite de detección, basada en una adecuada interpretación de la fase significativamente diferente. El límite de detección es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, se define como tres veces la desviación estándar de la lectura del promedio de los blancos (Figura No. 3) (Miller, 2002).

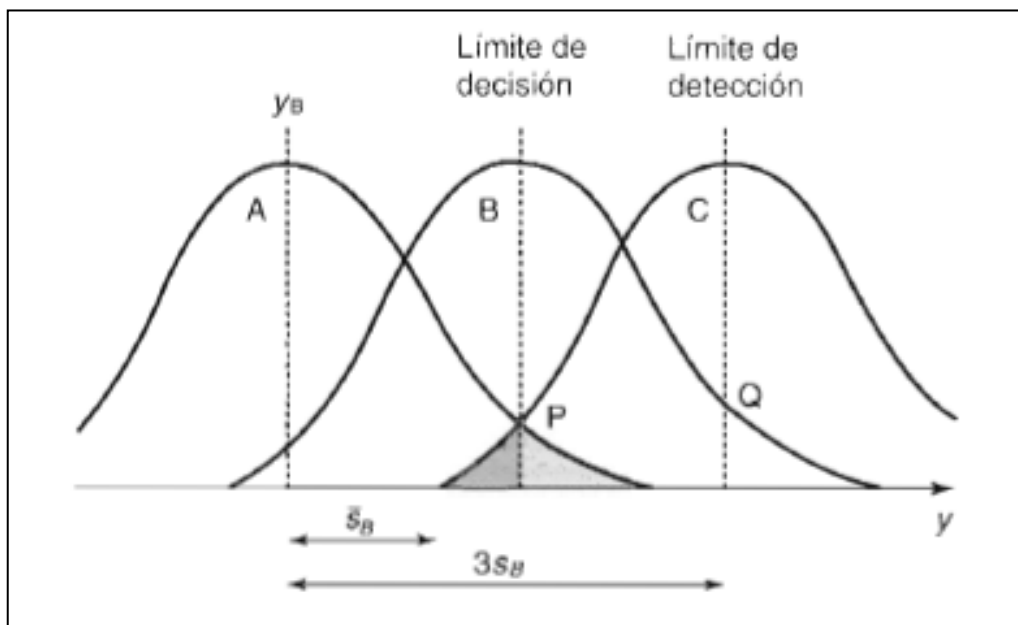


Figura No. 3. Límite de detección y parámetro de decisión de un analito (Miller, 2002).

El estudio del límite de detección muestra en principio dos problemas: la presencia del analito cuando de hecho está ausente y es igualmente importante informar que está ausente cuando de hecho está presente (Miller, 2002).

3.7.4 Linealidad

La linealidad hace referencia a la habilidad dentro de un mismo rango, de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Por lo general la selección del rango se encuentra directamente relacionada con la linealidad (Bloom, 2007).

Los resultados deben de ser evaluados por un método estadístico apropiado como lo es el coeficiente de regresión lineal. Afirma que deben establecerse como mínimo 5 puntos distintos con un intervalo igual entre cada punto para que de esta forma sea representativa la linealidad del método en cuestión. (Bloom, 2007).

Para que la linealidad sea aceptable dentro de un rango específico el coeficiente de regresión lineal debe encontrarse lo más cercano a uno posible ($R^2 = 0.99$) (OGA, 2006).

3.7.5 Rango

El rango se refiere al intervalo entre el mínimo y el máximo nivel de concentración para el cual la linealidad, exactitud y precisión son confiables. Para un determinado rango los factores de desempeño linealidad, exactitud y precisión deben encontrarse dentro del criterio de la institución de acreditación del país donde se efectúa el ensayo (Bloom, 2007).

A concentraciones menores de analito es difícil que uno de los tres parámetros de desempeño no sea aceptado por lo cual el rango del método utilizado para el fin específico no cumple con su objetivo. A concentraciones intermedias la posibilidad de utilizar un rango apropiado es mayor (Bloom, 2007).

IV. OBJETIVOS

4.1 General:

- Implementar y verificar el método AOAC 968.08 para la determinación de Cobre (Cu) en el musculo de camarón utilizando espectrofotómetro de llama.

4.2 Específicos:

- Implementar el método AOAC 968.08 para las condiciones del Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura y las características de la matriz del analito.
- Determinar los parámetros de desempeño, exactitud, especificidad, límite de detección, linealidad y rango para el método espectrofotométrico por absorción atómica para la determinación de Cobre (Cu) utilizando el método AOAC 968.08.
- Verificar si el método a ser empleado en el Laboratorio de Sanidad Acuicola cumple con los criterios de aceptación de la OGA para los fines que fue creado.

V. METODOLOGIA

5.1 Descripción del área

El área utilizada para el proyecto de investigación es el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA- ubicado dentro del campus universitario de la Universidad San Carlos en el edificio T-14 (Figura No. 4).



Figura No. 4. Ubicación del CEMA dentro del campus universitario (www.usac.gob.gt).

El Laboratorio de Sanidad Acuícola (Figura No. 5) de CEMA cuenta con un área equipada para ser utilizada en prácticas y diagnósticos del curso de Enfermedades Acuícolas, cuenta con un área de residuos equipada con HPLC (por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) y con un espectrofotómetro de absorción atómica.



Figura No. 5. Laboratorio de Sanidad Acuicola de CEMA (Trabajo de campo, 2009).

Para el desarrollo de las prácticas espectrofotométricas se contó con una campana de absorción de flujo laminar, espacio físico para el almacenamiento de cristalería, materiales y espacio para el almacenamiento de gases.

El área de espectrofotometría de -CEMA- se encuentra provista con el equipo (Cuadro No. 1).

Cuadro No. 1. Equipo de Absorción Atómica AA

1	Generador automático de hidruros
1	Horno de grafito con sistema de re-circulación de agua
1	Automuestreador
1	Lámpara de cobre
1	Lámpara de mercurio
1	Lámpara de plomo
1	Lámpara de zinc
1	Lámpara de hierro
1	Lámpara de aluminio
1	Lámpara de molibdeno
1	Lámpara de fosforo
1	Lámpara de potasio
1	Lámpara de arsénico
1	Lámpara de cadmio
1	Lámpara de calcio
1	Estufa de calentamiento y agitación
1	Campana de extracción de gases de 3 pies de ancho
1	Licuadaora con vaso de 4 onzas y 1.25 litros

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Equipo SHIMADZU AA6800 (Figura No. 6) con el cual se trabajó en los parámetros de desempeño e implantación del método:



Figura No. 6. Equipo de Absorción Atómica, Espectrofotómetro de CEMA (Trabajo de campo, 2009).

El laboratorio a su vez cuenta con una serie de equipos y materiales de apoyo para la preparación de muestras (Cuadro No. 2), así como con cristalería (Cuadro No.3) y reactivos (Cuadro No.4).

Cuadro No. 2. Equipo auxiliar de AA

2	Tabla plástica
2	Cuchillo con mango de madera
1	Embudo plástico
3	Espátula con mango de madera
3	Pipetor en forma de pera rojo
5	Bulbo amarillo
5	Bulbo azul
3	Pizeta
1	Choconoy
	Papel filtro
16	Crisoles de porcelana 50ml
10	Varillas de agitación
3	Rejilla para tubo de ensayo

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Cuadro No. 3. Cristalería para AA

10	Balón aforado de 100ml "B" con tapadera azul
4	Balón aforado de 100ml "A"
5	Balón aforado de 250ml
2	Balón aforado de 100ml enanos
1	Embudo de vidrio
3	Becker 1000ml
2	Becker 200ml
8	Becker 100ml
8	Becker 2000ml
10	Pipeta 1ml "B"
50	Pipeta 1ml volumétrica
50	Pipeta 5ml volumétrica
50	Pipeta 10ml volumétrica
5	Pipeta 10ml "B"
1	Erlenmeyer 500ml
5	Erlenmeyer 300ml
5	Probeta 500ml
5	Probeta 100ml
10	Balones de 50ml con tapadera roja
15	Balones aforados 100ml con tapadera roja

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Cuadro No. 4. Reactivos para AA

1	Estándar de plomo 1000ppm
1	Estándar de cromo 1000ppm
1	Estándar de arsénico 1000ppm
1	Estándar de aluminio 1000ppm
1	Estándar de cobre 1000ppm
1	Acido nítrico

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

5.2 Variables de evaluación

Para la implementación y verificación del método AOAC 968.08, en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura se estudiaron cinco de los principales parámetros de desempeño, los cuales fueron los siguientes:

- ✓ Exactitud: cercanía de la media al valor aceptado o verdadero.
- ✓ Especificidad: dato teórico, capacidad de distinguir entre un analito e impurezas.

- ✓ Límite de detección: concentración más pequeña que se puede detectar con un cierto nivel de confianza.
- ✓ Linealidad: se refiere a que tanto se relacionan los datos de dos variables distintas (una conocida y una desconocida).
- ✓ Rango: es el intervalo de concentraciones a las cuales el equipo es o no confiable.

5.3 Análisis e interpretación de resultados

Para cada parámetro de desempeño o variable de evaluación se realizaron varias operaciones de análisis las cuales se describen a continuación. Los procedimientos de evaluación de cada parámetro en los cuales se tomó en cuenta las sugerencias de procedimiento planteadas por la Oficina Nacional de Acreditación (OGA).

5.3.1 Exactitud

Se preparó una curva de calibración (Anexo No. 1) con concentraciones conocidas para realizar una curva de regresión lineal ($R^2 = Y = mX + b$).

La curva de calibración se inició con concentración de cero y no excedió cinco concentraciones, las cuales no estuvieron distanciadas 50% de la concentración más baja y 150% de la concentración más alta. Las concentraciones teóricas utilizadas fueron 0ppm, 0.2ppm, 0.4ppm, 0.6ppm, 0.8ppm y 1ppm; pues se esperaba que en la matriz la concentración de analito estuviera entre estos valores (Figura No. 7).

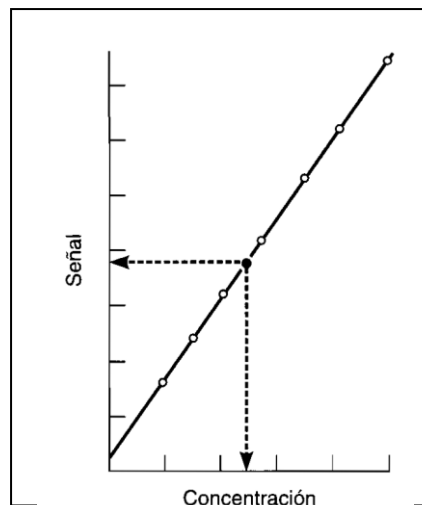


Figura No. 7. Curva de calibración (Prentice Hall, 2002).

Se calibró el equipo para obtener una curva de calibración para leer las distintas concentraciones; utilizando concentraciones conocidas, llamadas estándares. Seguido a esto se leyeron los estándares con concentraciones conocidas como muestras seis veces consecutivas. Se leyeron las distintas concentraciones de la muestra uno, posteriormente se leyeron las concentraciones de la muestra dos y así consecutivamente cada contracción ([]) de cada una las muestras (Figura No. 8).

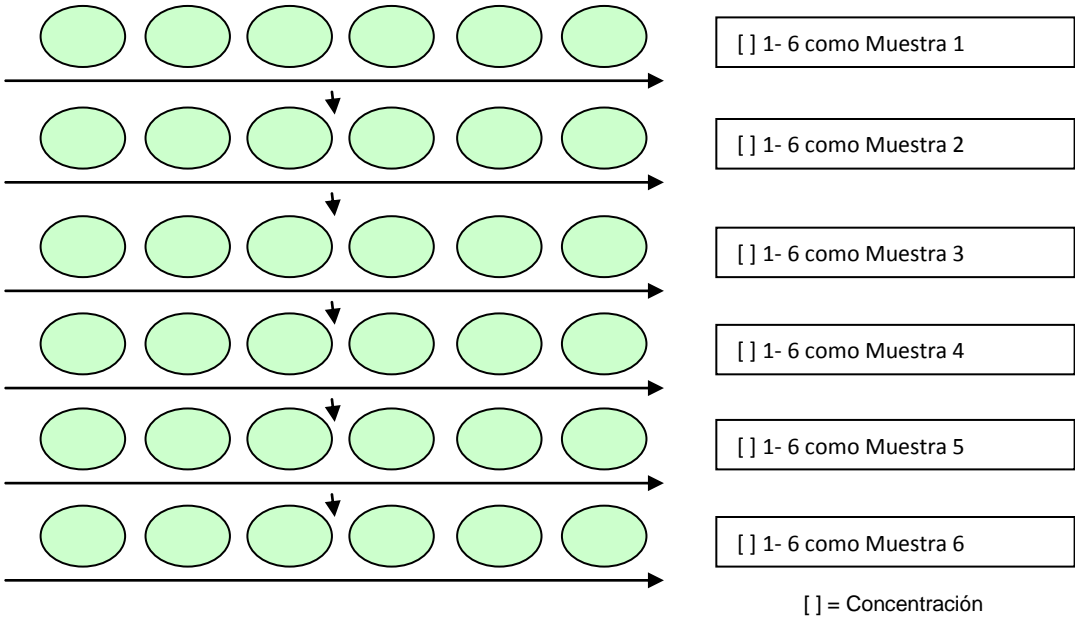


Figura No. 8. Corrida de estándares como muestra (Trabajo de campo, 2009).

Se colocaron los resultados en una tabla de Excel® (Cuadro No. 5); se determinó el porcentaje de recuperación usando la formula que se observa a continuación.

$$\text{Porcentaje de Recuperación} = \frac{\text{Valor experimental}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

Cuadro No. 5. Colecta y análisis estadístico del parámetro de desempeño Exactitud

No. Muestra	[] 0	[] 0.2	% rec.	[] 0.4	% rec.	[] 0.6	% rec.	[] 0.8	% rec.	[] 1	% rec.
1											
2											
3											
4											
5											
6											
Media											
Desviación estándar											
Coficiente de variación											

[] = Concentración, % Rec= Porcentaje de recuperación

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Se analizaron los datos obtenidos y se realizaron operaciones de estadística, media, desviación estándar, y coeficiente de variación; para tener una mejor visión del comportamiento. A continuación se muestran las formulas estadísticas utilizadas.

Media:

$$\mu = \frac{a1 + \dots + an}{n}$$

Donde:

μ = Media
a1 = Primer dato
an = Ultimo dato
n = No de datos

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{(\mu i - \mu T)^2}{n - 1}}$$

Donde:

S = Desviación Estándar
μi = Media la muestra
μT = Media de la población
n = Muestra

Coeficiente de variación (Varianza):

$$CV = S / X$$

Donde:

CV = Coeficiente de Variación
S = Desviación Estándar
X = Promedio

Intervalo de confianza:

$$IC = \mu \pm LE \times 100$$

Donde:

IC = Intervalo de confianza

μ = Media

LE = Limite de confianza

Para el parámetro de desempeño exactitud, se utilizó el criterio de aceptación que plantea la OGA el cual indica que para que este parámetro sea aceptado el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 90 y 110% del valor teórico. Los porcentajes menores pueden ser aceptables basados en la necesidad del método (OGA, 2006).

5.3.2 Especificidad

Para determinar la especificidad se recurrió a la revisión de los manuales del equipo de absorción atómica en este caso al Cook Book de AA6800 de SHIMADZU. Este parámetro de desempeño se muestra en la resolución hacia los componentes del equipo.

El criterio de evaluación para este método se refiere a que los componentes del equipo no interfieran con el análisis del analito en cuestión.

5.3.3 Límite de detección

Se preparó una curva de calibración (Procedimiento, Anexo No.1) con concentraciones conocidas (0ppm, 0.2ppm, 0.4ppm, 0.6ppm, 0.8ppm y 1ppm) y se leyó la curva en el equipo.

Para la evaluación de este parámetro de desempeño se realizó una curva de calibración, se prepararon cinco blancos (Procedimiento, Anexo No. 2) los cuales fueron leídos por el equipo de absorción atómica SIMADZU AA6800 seis veces alternativas (Figura No. 9).

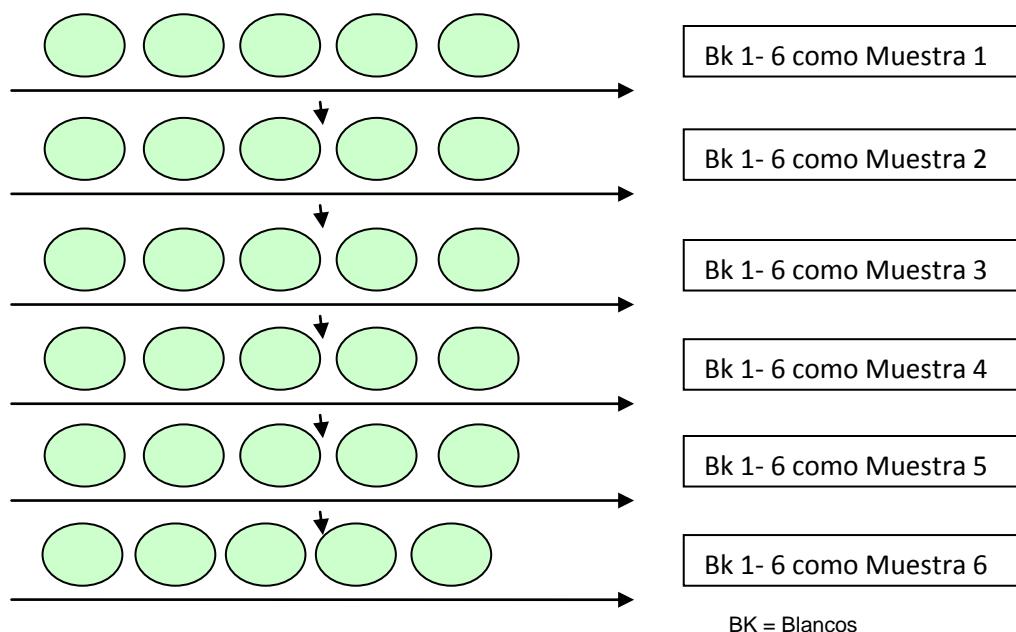


Figura No. 9. Corrida de blancos como muestra (Trabajo de campo, 2009).

Luego de leídos los resultados de concentraciones se colocaron en la tabla de Excel[®] (Cuadro No. 6). Utilizando las concentraciones que da el equipo para cada blanco leído como muestra. Adicionalmente se estimó la media, desviación estándar y coeficiente de variación para así determinar la concentración menor que puede ser leída por el equipo.

Cuadro No. 6. Concentración de los blancos leídos como muestra

Muestras / Blancos	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3	Blanco 4	Blanco 5
Bk como M 1					
Bk como M 2					
Bk como M 3					
Bk como M 4					
Bk como M5					
Bk como M6					
Promedio					
Desviación Estándar					BK= Blanco
Coeficiente de V.					M= Muestra

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

El criterio de aceptación de este parámetro es la estimación de la multiplicación de la desviación estándar promedio por tres, siendo el valor resultado el límite de detección.

5.3.4 Linealidad

Para la evaluación de este parámetro se necesitó realizar una curva de calibración con concentraciones conocidas 0ppm, 0.2ppm, 0.4ppm, 0.6ppm, 0.8ppm y 1ppm. Luego de preparada la curva ésta fue leída en el equipo.

Se leyó la misma curva de calibración como muestra seis veces alternativas (Figura No. 10).

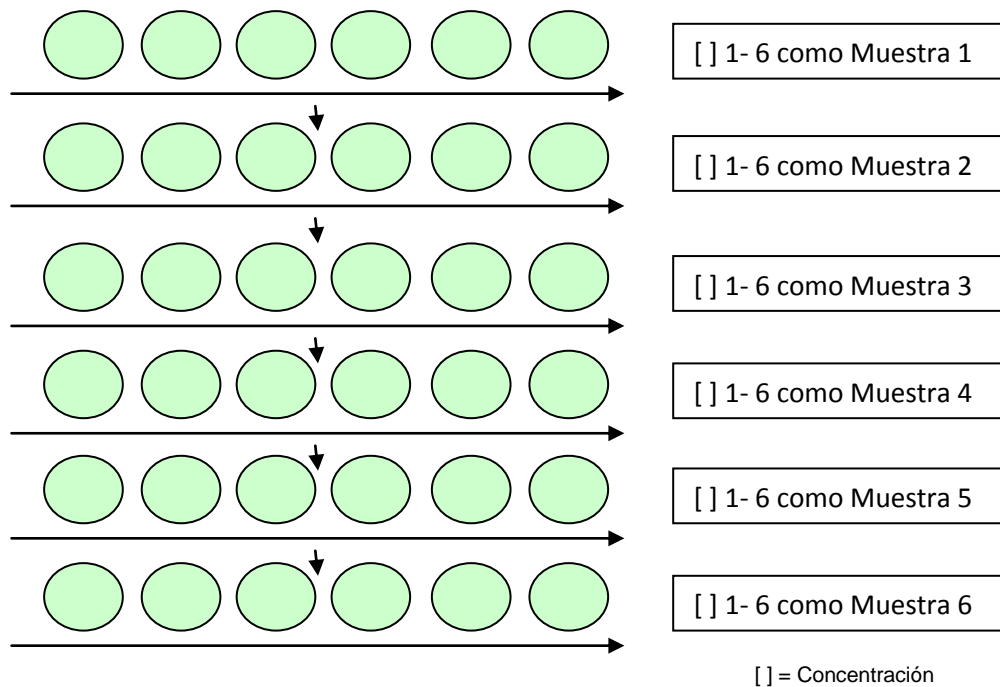


Figura No.10. Corrida de concentración de blancos como muestra (Trabajo de campo, 2009).

Se diagramó la curva de calibración utilizada en este parámetro en el programa Excel® para hacer constar que el coeficiente de regresión lineal utilizado para evaluar este parámetro es lineal (Figura No. 11).

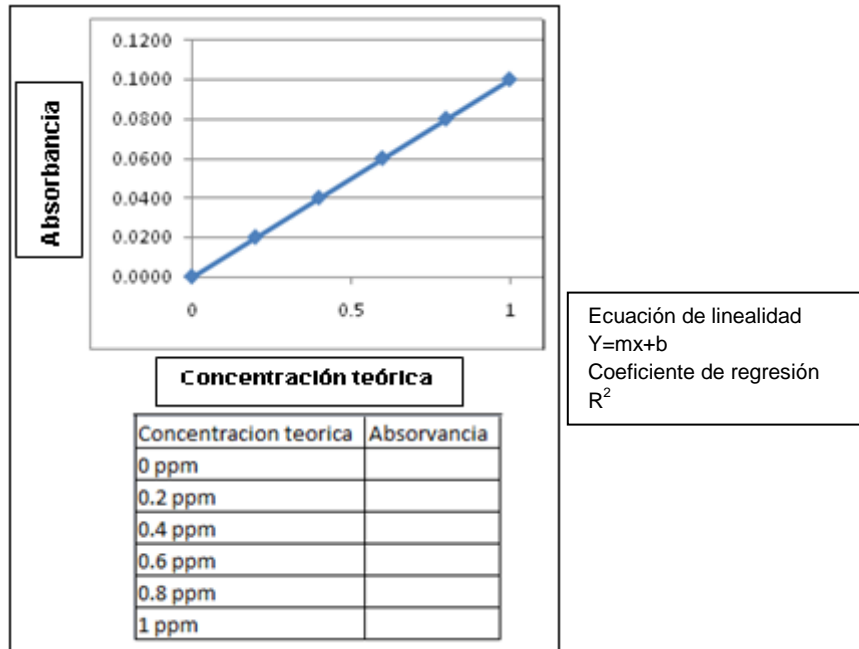


Figura No.11. Ejemplo de curva de calibración (Trabajo de campo, 2009).

Con los resultados obtenidos de las lecturas se llenó la tabla de Excel® (Cuadro No. 7).

Cuadro No. 7. Colecta de información de la concentración de los blancos leídos como muestra

	0 ppm	0.2 ppm	0.4 ppm	0.6 ppm	0.8 ppm	1 ppm
St como muestra 1						
St como muestra 2						
St como muestra 3						
St como muestra 4						
St como muestra 5						
St como muestra 6						
Promedio						
Desviación estándar				St=estándar		
Coeficiente de V.						

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Tabulados los resultados, se utilizó el promedio de las lecturas de los estándares leídos como muestras a cada concentración para realizar una curva de correlación lineal de donde se extrajo el valor de la ecuación de regresión lineal (Figura No. 12).

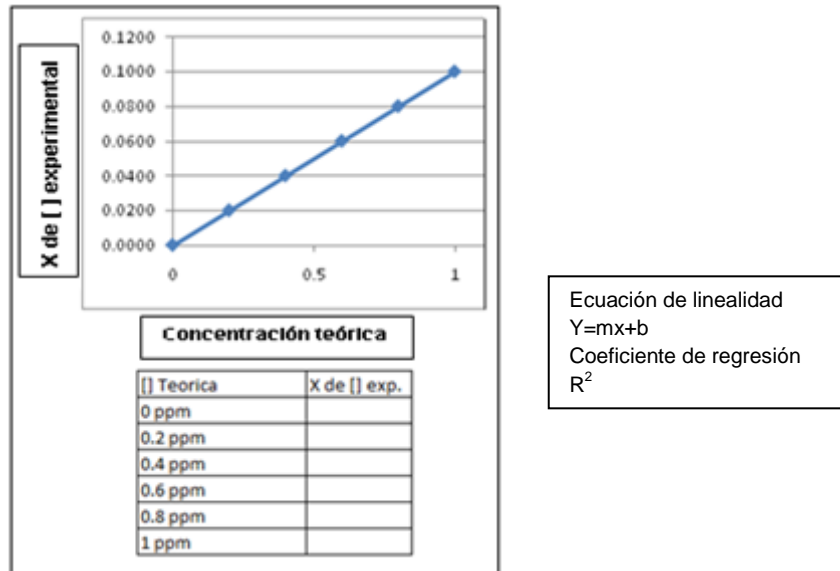


Figura No.12. Curva de ecuación lineal de los promedio (Trabajo de campo, 2009).

Se utilizaron los datos de los promedios para realizar una gráfica que muestra la razón de respuesta (razón de respuesta = concentración exp. / concentración teórica) en donde los valores del eje X fueron los correspondientes a la concentración teórica y los valores del eje Y fueron la razón de respuesta (Figura No.13) se muestra un ejemplo para la gráfica y la colecta de información.

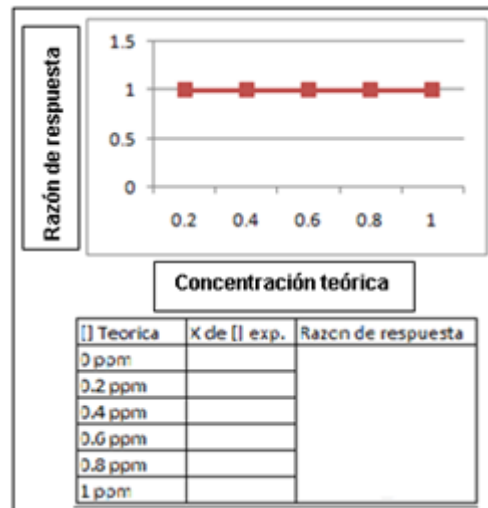


Figura No.13. Linealidad del método (Trabajo de campo, 2009).

Para que la linealidad cumpla con el criterio de aceptación la razón de respuesta puede variar de 1% a 5% (OGA, 2006).

5.3.5 Rango

Para el parámetro de desempeño de rango se repasaron los resultados de precisión, exactitud y linealidad. Utilizando la información obtenida de los resultados de estos parámetros de desempeño se evaluó si el rango de trabajo es aceptable o no.

Para que el parámetro de desempeño rango se encuentre dentro del criterio de aceptación planteado por OGA los parámetros de desempeño precisión, exactitud y linealidad deben de haber cumplido su criterio específico de aceptación.

5.4 Recolección de la información

La documentación para cada parámetro de desempeño fue la siguiente, según sea el parámetro.

- ✓ Documentación para exactitud: Para cada muestra se reportó el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Se calculó el promedio, la desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Se llevó un registro de los resultados en una hoja de datos.
- ✓ Documentación para especificidad: Se registraron los datos que muestren la resolución del método.
- ✓ Documentación para límite de detección: Se determinó la menor concentración a la que se detecta el analito en la matriz de la muestra.
- ✓ Documentación para linealidad: Se registró los resultados en una hoja de datos. Se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada concentración. Se graficó la media que corresponde para cada concentración (eje de las Y) en función de la concentración (eje de las X). Se calculó la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) se registraron estos cálculos en la hoja de datos.
- ✓ Documentación para rango: Se registró el rango de trabajo en la hoja de datos.

VI. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

6.1 Evaluación de exactitud

Para cada día de trabajo se realizó una curva de calibración (Cuadro No. 8).

Cuadro No. 8. Curva de calibración para cada día de trabajo

Día de trabajo	Resultado de curva de calibración
25.08.2008	0.9990
26.08.2008	0.9995
27.08.2008	0.9996
27.08.2008	0.9996

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Como se observa todos los valores de la curva de calibración se encuentran dentro del valor que plantea la OGA el cual es de 0.98 como aceptable para la lectura del parámetro de desempeño de exactitud.

Los resultados (Cuadro No. 9) que proporcionó el equipo SHIMADZU AA6800 para los estándares leídos como muestra, en el mismo cuadro se muestran los resultados de la operación que da como resultado el porcentaje de recuperación para cada valor.

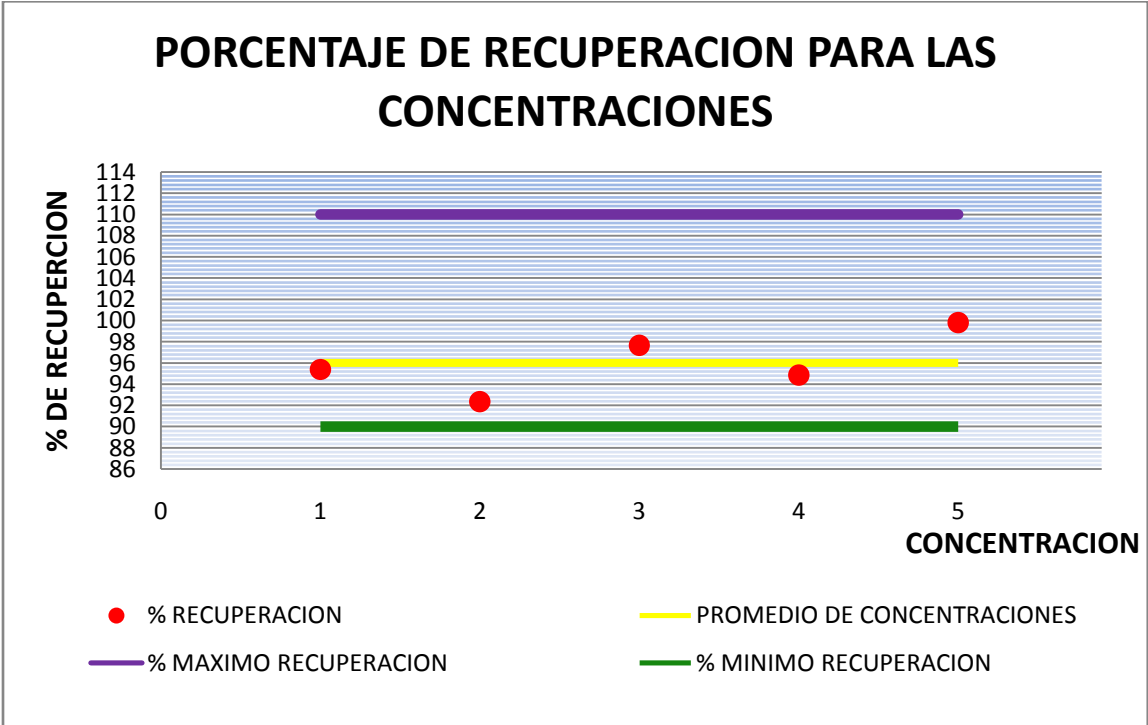
Cuadro No. 9. Evaluación de exactitud

	ST2CML	% Rec 0.2	ST3CML	% Rec 0.4	ST4CML	% Rec 0.6	ST5CML	% Rec 0.8	ST6CML	% Rec 1.0
Repetición 1	0.1898	94.9	0.3772	94.3	0.5928	98.8	0.7651	95.6375	1.0138	101.38
Repetición 2	0.1912	95.6	0.3693	92.325	0.587	97.8333	0.7614	95.175	0.995	99.5
Repetición 3	0.1927	96.35	0.3729	93.225	0.5819	96.9833	0.7614	95.175	0.9965	99.65
Repetición 4	0.1955	97.75	0.3714	92.85	0.5819	96.9833	0.7514	93.925	0.9936	99.36
Repetición 5	0.1878	93.9	0.3642	91.05	0.5834	97.2333	0.7571	94.6375	1.0022	100.22
Repetición 6	0.1876	93.8	0.3613	90.325	0.5884	98.0667	0.7564	94.55	0.9871	98.71

ST2CML= estándar 2 como muestra, ST3CML= estándar 3 como muestra, ST4CML= estándar 4 como muestra, ST5CML= estándar 5 como muestra, ST6CML= estándar 6 como muestra

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

La OGA establece que para que este parámetro de desempeño se encuentre dentro del criterio de aceptación que ellos plantean, el porcentaje de recuperación de todos los estándares leídos como muestra, deben de estar entre 90 y 110% de porcentaje de recuperación. Para todos los estándares leídos como muestra el porcentaje de recuperación está dentro del criterio de aceptación de la OGA, siendo su porcentaje de recuperación cercano al límite inferior del porcentaje sugerido pues las concentraciones de trabajo para la determinación de Cu en el musculo de camarón son bajas (Figura No. 14).



% máximo de recuperación y % mínimo de recuperación según OGA

Figura No. 14. Porcentaje de recuperación para las distintas concentraciones (Trabajo de campo, 2009).

6.2 Evaluación de especificidad

Las interferencias instrumentales son pequeñas para el análisis de Cu según el manual específico del equipo SHIMADZU AA6800 (AA COOKBOOK Atomic Absorption Spectroscopy), sección 3 página 16 y los componentes del mismo son altamente específicos para la determinación de Cu. Las condiciones de operación del equipo para la determinación de Cobre deben de ser las recomendadas por el espectrofotómetro que se utilizó (Cuadro No. 10)

Cuadro No. 10. Condiciones de operación para la determinación de Cu utilizando el equipo SHIMADZU AA6800

Condiciones de operación	Rango
Corriente	6m A/0 mA
Longitud de onda	324.8 nm
Anchura de ranura	0.5 nm
Modo de lampara	BGC D ²
Altura del mechero	7mm
Angulo del mechero	0 grados
Flujo de gas	1.8 l/min
Tipo de oxidante	Aire

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

6.3 Evaluación del límite de detección

Para evaluar el límite de detección se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas (0ppm, 0.2ppm, 0.4ppm, 0.6ppm, 0.8ppm y 1ppm). Se prepararon cinco blancos los cuales fueron leídos seis veces durante cuatro días consecutivos (Cuadro No. 11).

Cuadro No. 11. Evaluación de lectura de blancos

Fecha	BK1CM	BK2CM	BK3CM	BK4CM	BK5CM
25.08.2008	-0.0013	-0.0056	-0.0042	-0.0056	-0.0005
	0.0031	0.0002	-0.0042	-0.0027	-0.0034
	-0.0013	-0.0042	-0.0078	-0.0063	-0.0034
	-0.0005	-0.0005	-0.002	-0.0063	-0.0005
	-0.0005	0.0016	-0.0013	-0.0092	0.0016
	0.0031	-0.0013	-0.0078	-0.0085	0.0038
26.08.2008	0.005	-0.0046	0.002	-0.0065	-0.0033
	0.0044	-0.0052	-0.0039	-0.0078	-0.0033
	0.0018	-0.0052	-0.002	-0.0027	-0.0007
	-0.0007	0.0025	-0.0046	-0.0059	-0.002
	0.0006	-0.002	-0.0059	-0.0046	-0.002
	-0.002	0.0006	-0.0039	-0.0027	-0.0027
27.08.2008	-0.0076	-0.0109	-0.0083	-0.0076	-0.0031
	-0.0083	-0.0129	-0.0076	-0.007	-0.007
	-0.0096	-0.0135	-0.0083	-0.0089	-0.0005
	-0.007	-0.0122	-0.0063	-0.0102	-0.0063
	-0.005	-0.0089	-0.0089	-0.0142	-0.0083
	-0.0057	-0.0116	-0.0129	-0.0109	-0.0057
28.08.2008	-0.0058	-0.008	-0.0143	-0.0094	-0.0072
	-0.0087	-0.0094	-0.0101	-0.008	-0.0087
	-0.0058	-0.0065	-0.0122	-0.0108	-0.0087
	-0.0051	-0.0072	-0.0122	-0.0108	-0.008
	-0.008	-0.008	-0.0136	-0.0115	-0.0108
	-0.0122	-0.0108	-0.0108	-0.0122	-0.0136

BK1CM=Blanco No. 1 como muestra BK2CM=Blanco No. 2 como muestra BK3CM=Blanco No. 3 como muestra BK4CM=Blanco No. 4 como muestra BK5CM=Blanco No. 5 como muestra (Datos en ppm)

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

El criterio de aceptación para OGA de este parámetro es la estimación de la multiplicación de la desviación estándar promedio por tres, siendo el valor resultado el límite de detección (Cuadro No. 12).

Cuadro No. 12. Estadísticos limite de detección

	BK1CM	BK2CM	BK3CM	BK4CM	BK5CM
PROMEDIO	-0.0032	-0.0060	-0.0071	-0.0079	-0.0043
S	0.0042	0.0042	0.0042	0.0042	0.0042
2S	0.0085	0.0085	0.0085	0.0085	0.0085
3S	0.0127	0.0127	0.0127	0.0127	0.0127

BK1CM=Blanco No. 1 como muestra BK2CM=Blanco No. 2 como muestra BK3CM=Blanco No. 3 como muestra BK4CM=Blanco No. 4 como muestra BK5CM=Blanco No. 5 como muestra (Datos en ppm)

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Promedio de la desviación estándar de los cinco blancos leídos como muestra (Figura No. 15) así como el contraste con este valor y el valor de tres veces la desviación estándar para cada uno de los blancos. Siendo aceptable que los resultados de los blancos leídos no se desvíen de la media mas de 3 desviaciones estándar, por lo que el límite de detección es aceptado por la OGA.

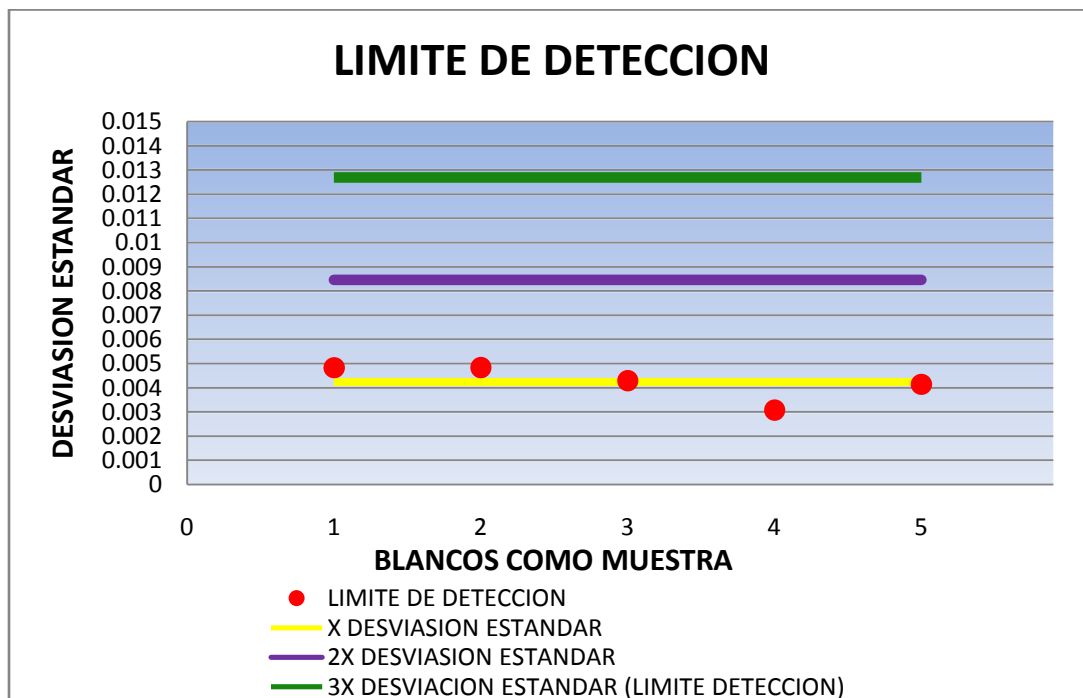


Figura No. 15. Gráfica del límite de detección (3 desviaciones estándar de la media de blancos) (Trabajo de campo, 2009).

6.4 Evaluación de linealidad

Los resultados obtenidos de los promedios de la absorbancia y la regresión lineal, es evidente la relación que existe entre la concentración teórica y la absorbancia dada por el equipo AA6800 de SHIMADZU para el método AOAC 968.08 para la determinación de Cobre en musculo de camarón (Cuadro No. 13).

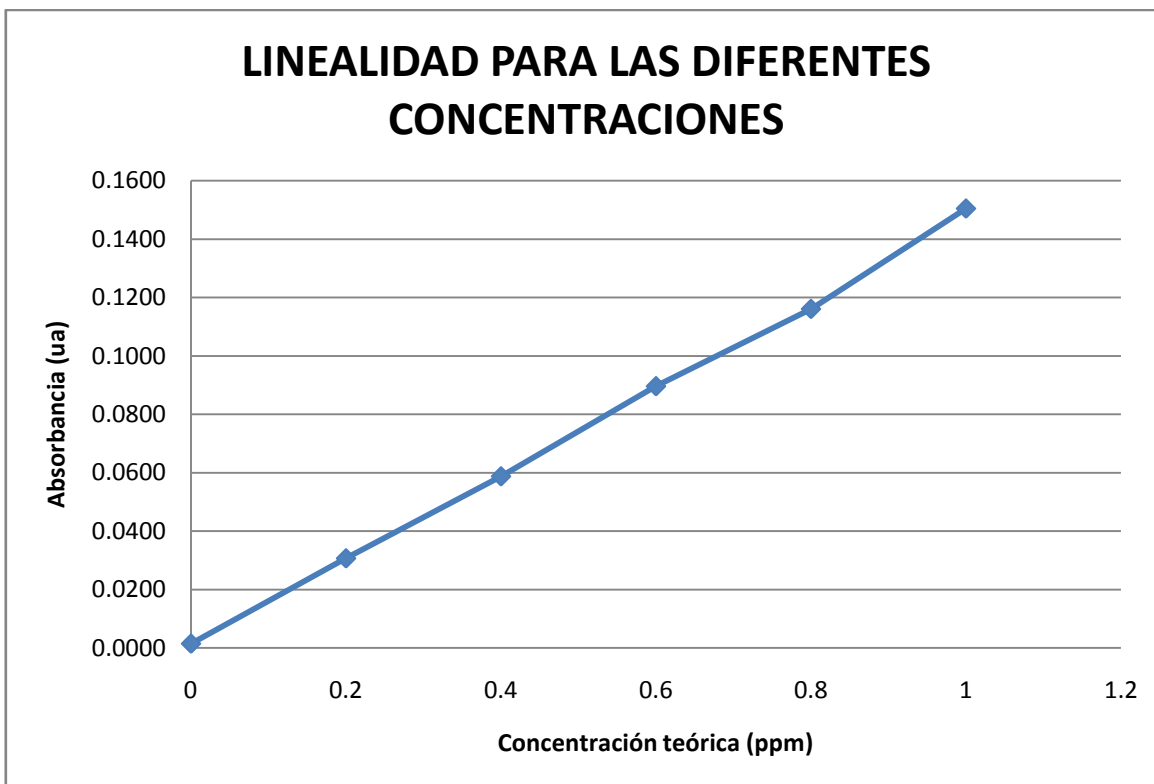
Cuadro No. 13. Linealidad

	Concentración Teórica (ppm)	Absorbancia (ua)	R2
25.08.2008	0	0.0016	0.9991
	0.2	0.0288	
	0.4	0.0542	
	0.6	0.084	
	0.8	0.1082	
	1	0.1422	
26.08.2008	0	0.0014	0.9996
	0.2	0.0314	
	0.4	0.0621	
	0.6	0.0931	
	0.8	0.1223	
	1	0.1586	
27.08.2008	0	0.0016	0.9996
	0.2	0.0322	
	0.4	0.0618	
	0.6	0.093	
	0.8	0.1213	
	1	0.1566	
28.08.2008	0	0.0012	0.9996
	0.2	0.0302	
	0.4	0.0568	
	0.6	0.0883	
	0.8	0.1124	
	1	0.1443	

Datos en ppm

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Para todos los días que fue evaluado este parámetro de desempeño el resultado de la regresión lineal cae dentro del criterio de aceptación planteado por la OGA que establece que los valores de R^2 deben de ser de 0.999. En la Figura No. 16 puede observarse de forma grafica la linealidad que muestran los datos de la concentración teórica y la absorbancia dada por el equipo de absorción atómica.



Ecuación lineal ($Y=mx+b$), Coeficiente de regresión lineal ($r^2 = 0.99954551$)

Figura No. 16. Linealidad para las distintas concentraciones (Trabajo de campo, 2009).

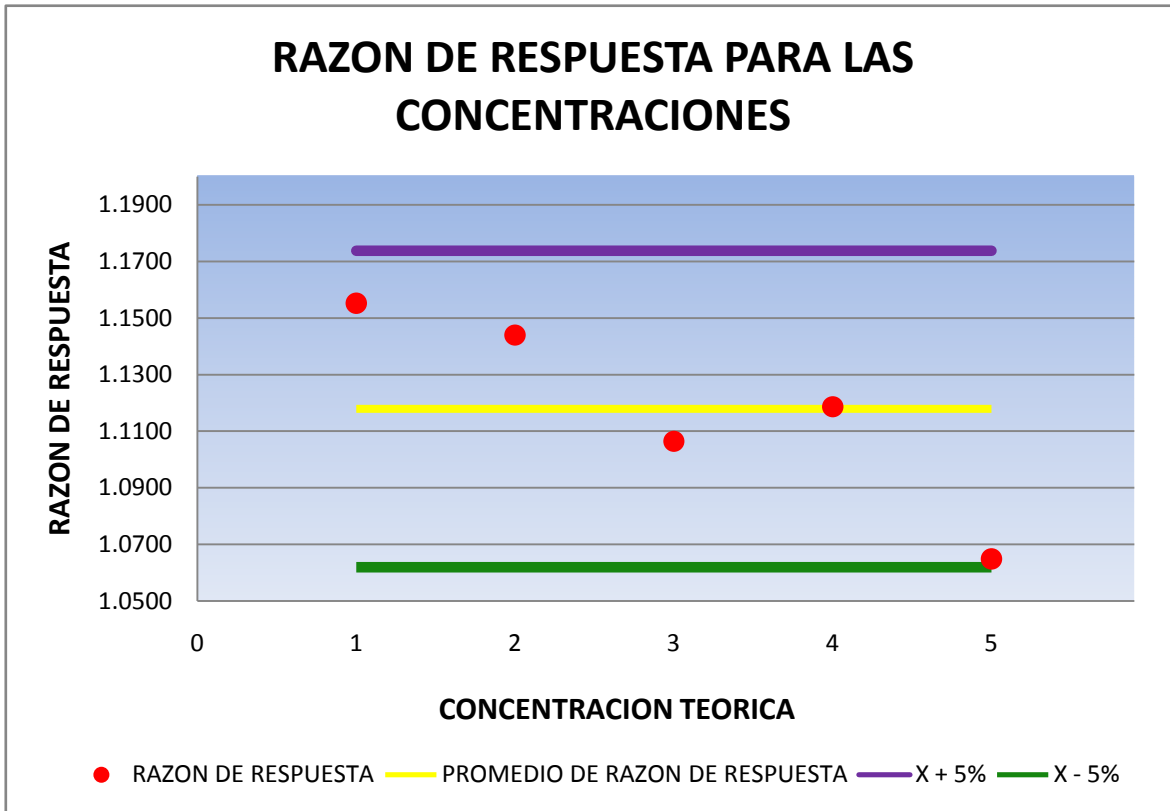
Como prueba confirmatoria para este parámetro se llevó a cabo la verificación de los resultados, utilizando el parámetro razón de respuesta para el cual OGA establece que la razón de respuesta (concentración experimental / concentración teórica) puede variar de 1% a 5%, sin ser excedidos estos valores, se realizó el cálculo de razón de respuesta (Cuadro No. 14), evidenciándose que para todas las concentraciones la razón de respuesta no varía en más de un 5% de la concentración teórica.

Cuadro No. 14. Razón de respuesta promedio para las distintas concentraciones

CONCENTRACION TEORICA (ppt)	RAZON DE RESPUESTA
0.2	1.1553
0.4	1.1441
0.6	1.1065
0.8	1.1187
1	1.0649

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

La razón de respuesta (Figura No. 17.) para cada una de las concentraciones se encuentra dentro del criterio de aceptación planteado por OGA, determinándose de esta forma que el método utilizado es lineal.



X = Promedio de razón de respuesta

Figura No. 17. Razón de respuesta para las concentraciones teóricas (Trabajo de campo, 2009).

6.5 Evaluación de rango

Los porcentajes de recuperación son aceptables, por lo que el rango de trabajo es exacto, la linealidad indicó que existe una relación directa la cual no varía en más de 5 % de la media entre los datos de la concentración teórica y la absorbancia dada por el equipo.

La linealidad y la exactitud del método AOAC 968.08 para la determinación de Cu en el músculo de camarón son aceptados según los criterios de evaluación de OGA, por lo que el rango de concentración de 0 ppm a 1 ppm es aceptado como rango lineal y exacto para trabajar el analito Cobre en la matriz músculo de camarón.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 El método AOAC 968.08 para la determinación de Cobre (Cu) en camarón utilizando el espectrofotómetro AA6800 de SHIMADZU, fue implementado en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA siendo este un método apropiado y al alcance del laboratorio para la determinación de dicho elemento.
- 7.2 La cuantificación y determinación de Cobre (Cu) en camarón para el método AOAC 968.08 cumple con los criterios de aceptación de la OGA.
- 7.3 Se verificó por medio de la repetición los parámetros de desempeño, exactitud, especificidad, límite de detección, linealidad y rango para el método espectrofotométrico por absorción atómica para la determinación de Cobre (Cu) en camarón utilizando espectrofotómetro AA6800 de SHIMADZU.
- 7.4 El rango de operación de 0ppm a 1ppm para el análisis de Cu en el músculo camarón utilizando la técnica de llama con el equipo AA6800 de SHIMADZU es aceptado por la OGA, según el criterio de aceptación que se plantea en el 2007.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1 Realizar investigaciones que permitan la implementación y verificación de otros métodos de análisis en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA, para que en el mismo se realicen procedimientos estándares, que puedan dar lugar a la venta de servicios de análisis de residuos inorgánicos.

- 8.2 Mantener la innovación en la implementación de técnicas analíticas de laboratorio dando lugar a que el Laboratorio de Sanidad Acuicola se encuentre a la vanguardia de la tecnología para la realización de análisis que contribuyan con el desarrollo del hidrobiológico del país.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, G. 1983. Los elementos de la tabla periódica: una maravilla. 2 ed. Argentina, Editorial Rio de Plata. 163 p.
2. Bloom, J. 2008. Validación de metodologías analíticas para el análisis de productos farmacéuticos. Puerto Rico, Lenix. 288 p.
3. CESCO (Centro de Estudios y Control de Contaminantes, HN); UNAH (Institut de genie de l'environnement ecotoxicologie, CH). 1994. Determinación de plomo y cobre en peces y manejo de sus residuos en el lago de Yojoa. Tegucigalpa, HN, CESCO. 54 p.
4. *Coca Cebollero, P; Rosique Jiménez, J. 2000. Ciencia de materiales: teoría - ensayos- tratamientos. Colombia, Pirámide. 345 p.*
5. Cole – Parmer. 2000. Instrumentación química. 3 ed. Canadá, McFly. 1239 p.
6. Escriba, C. 2007. Cuantificación de mercurio por la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con celda de vapor frio, en muestras de carne de tiburón provenientes de las costas del Atlántico y Pacífico de Guatemala. Tesis Lic. CCQ. Guatemala, USAC. 98 p.
7. García, G. 1997. Determinación y cuantificación de metales pesados (Pb, As, Cd y Cr VI) en sustancias tóxicas (PO₄ =, NO₂- y CN-) por métodos espectrofotométricos en tejido muscular de *Cichlasoma managuense* (Gunter) guapote o pez tigre en el lago de Amatitlán. Tesis Lic. Biol. Guatemala, USAC 62 p.
8. Gold GG; Jabany Casanovas, J. 1997. Atlas de mineralogía. s.l., Edibook. 94 p.
9. Hochleitner, R. 1997. Gran guía de la naturaleza: minerales y cristales. Madrid, Everest. 255 p.

10. INIA-S/NE (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, VE); Instituto Universitario de Tecnología Cumana, VE. 2007. Reporte de investigación: metales pesados (Cu+2, Cd+2, Pb+2, Zn+2) en músculo y cefalotórax de camarones silvestres *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. notialis* y *F. brasiliensis* de la región oriental de Venezuela. Venezuela, INIA. s.p.
11. Kestler, SD. 1997. Determinación cuantitativa de metales pesados en peces comestibles del Lago de Amatitlán por reflexión total de rayos X. Tesis Ing. CCQ. Guatemala, USAC. p. 40 – 49
12. Laws, H. 1981. Metales: impacto en el medio ambiente. 2 ed. Venezuela, Santilstart. 129 p.
13. Miller, J. 2002. Estadística y quimiometria para análisis químico. 4 ed. Madrid, Prentice- Hall. 897 p.
14. Murai, T; Andrews, JW ; Smith, RG. 1981. Effects of dietary copper on channel catfish (en línea). *Aquaculture*, 22: 353 – 357. Consultado 04 abr. 2008. Disponible en [http:// www.effectsdietarycopperonchannelcatfish/es/ing/#332](http://www.effectsdietarycopperonchannelcatfish/es/ing/#332)
15. OGA-GEC-016 (Oficina Guatemalteca de Acreditacion, GT). 2007. Política de selección y validación de métodos de ensayo. Oficina de Acreditación Guatemala. 29 p.
16. Reyes, M. 2007. Evaluación de la contaminación del pez blanco en tejido muscular y su relación con los niveles de calidad del agua del lago Peten Itza. Tesis Lic. CCQ. Guatemala, USAC. 33 p.
17. Roesch, RR. 1998. Determinación de algunos metales ecotóxicos y hábitos alimenticios del caracol *Pomacea*, sp del lago de Amatitlán. Tesis Lic. Acuicultura. Guatemala, USAC. 125 p.
18. Rottman Smith, L. 2003. Química analítica: principio de instrumentación. España, Madrilense. 233 p.

19. Scelzo, A. 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemisia longinaris* Bate (Crustácea, Decápoda, Penaeidae). Argentina, Universidad Nacional Mar del Plata. 177 p.
20. Sena, S; Trevor, A. 1995. Fish nutrition in aquaculture. Malasia, Chapman & Hall aquaculture series 1. p. 94, 179.
21. Skoog, D; West, D; Holler, F; Crouch, S. 2005. Fundamentos de química analítica. 8 ed. Mexico, Thomson. p. 851-884,1057.
22. Smith, WF. 1998. *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales*. Madrid, Mc Graw Hill. p. 786, 896.
23. Solem, T; Mendez, A; Arriaza, M. 1984. *Enciclopedia de ciencia y técnica*. 4 ed. México, Salvat Editores. tomo 4, 234 p.
24. Tacon, AGJ. 1995. Ictiopatología nutricional: signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. Roma, FAO. 1995. p. 15-21.
25. World Copper Factbook, AU. 2007. Mineralogics: copper. Australia, THOMSONS. 245 p.

X. ANEXO

Procedimiento para la preparación de una curva de calibración:

Preparar una solución madre (100ppm) a partir de un estándar de cobre con 1000ppm:

- ✓ Extraer con una pipeta volumétrica de 10ml, 10ml del estándar de cobre, colocarlos en un balón aforado de 100ml.
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml

Preparar la concentración 0ppm:

- ✓ Tomar 10ml de ácido nítrico con una pipeta volumétrica y colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml

Preparar la concentración 0.2ppm:

- ✓ Tomar 0.2ml de la solución madre con una pipeta volumétrica de 1ml colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Tomar 10ml de ácido nítrico con una pipeta volumétrica y colocarlo en el balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml
- ✓ Mezclar vigorosamente el contenido del balón aforado

Preparar la concentración 0.4ppm:

- ✓ Tomar 0.4ml de la solución madre con una pipeta volumétrica de 1ml colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Tomar 10ml de ácido nítrico con una pipeta volumétrica y colocarlo en el balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml
- ✓ Mezclar vigorosamente el contenido del balón aforado

Preparar la concentración 0.6ppm:

- ✓ Tomar 0.6ml de la solución madre con una pipeta volumétrica de 1ml colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Tomar 10ml de ácido nítrico con una pipeta volumétrica y colocarlo en el balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml

- ✓ Mezclar vigorosamente el contenido del balón aforado

Preparar la concentración 0.8ppm:

- ✓ Tomar 0.8ml de la solución madre con una pipeta volumétrica de 1ml colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Tomar 10ml de ácido nítrico con una pipeta volumétrica y colocarlo en el balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml
- ✓ Mezclar vigorosamente el contenido del balón aforado

Preparar la concentración 1 ppm:

- ✓ Tomar 1 ml de la solución madre con una pipeta volumétrica de 1ml colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Tomar 10ml de ácido nítrico con una pipeta volumétrica y colocarlo en el balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100ml
- ✓ Mezclar vigorosamente el contenido del balón aforado

Anexo No. 1

Procedimiento para la preparación de un blanco:

- ✓ En un balón aforado de 100ml, aplicar 10ml con una pipeta volumétrica de ácido nítrico a una concentración de 65%
- ✓ Aforar el balón de 100ml con agua destilada
- ✓ Mezclar vigorosamente el contenido del balón aforado

Anexo No. 2

4.8.02

AOAC Official Method 968.08
Minerals in Animal Feed and Pet Food
Atomic Absorption Spectrophotometric Method
First Action 1968
Final Action 1969

(Caution: See Appendix B, safety notes on AAS.)

A. Apparatus

Atomic Absorption spectrophotometer. –See **965.09A** (see 2.6.01)

B. Operating Parameters

See Table **965.09** (see 2.6.01). except use fuel-rich air-C₂H₂ flame for Ca and Mg, and ranges of operation for µg element/mL solution are: Ca 5-20, Cu 2-20, Fe 5-20, Mg 0.5-2.5, Mn 5-20, and Zn 1-5.

C. Reagents

(See introduction to **965.09B** [see 2.6.01]. Commercial prepared standard solutions may be used.)

a) Calcium standard solutions. – Prepare as in **965.09B(a)** (see 2.6.01).

b) Copper, iron, magnesium, manganese and zinc standard solution. –Prepare stock solution as in **965.09B (b), (c), (e), (f), and (g)** (see 2.6.01), and dilute aliquots with 0.1 -0.5N HCL to make ≥4 standard solutions of each element within range of determination.

D. Preparation of Sample Solution

a) Dry ashing (not applicable to mineral-mix feeds). –Ash 2-10 g sample in well-glazed porcelain dish. Start in cold furnace, bring to 550°, and hold 4h. Cool, add 10 mL 3N HCl, cover with water glass, and boil gently 10 min. Cool, filter into 100mL volumetric flask and dilute to volume with H₂O. Subsequent dilution with 0.1 -0.5NHCl may be necessary to bring sample solution into analytical range, except for Ca. Final Ca dilution must contain enough Ca solution. **965.09B (d)** (see 2.6.01), to provide 1% Ca concentration after dilution to volume with H₂O.

b) Wet digestion. –Proceed as in **935.13A (a)** (see 4.8.04), adding 25 ml HNO₃ for each 2.5 g sample and diluting to 100 mL with H₂O. Digestion can be made at low heat on hot plate, using 600 mL beaker covered with watch glass. Subsequent dilutions with 0.1-0.5N HCl may be necessary to bring sample solutions into analytical range, as in **(a)**.

E. Determination and Calculation

See **965.09D-E** (see 2.6.01).

References: JAOAC **51**, 776(1968); **54**, 666(1971); **59**, 937(1976); **60**, 465(1977).

Revised: March 1996

CAS-7440-70-2 (calcium)
CAS-7440-50-8 (copper)
CAS-7439-89-6 (iron)
CAS-7439-96-5 (manganese)
CAS-7440-66-6 (zinc)