

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

“VERIFICACIÓN DEL MÉTODO 968.08 AOAC A TRAVÉS DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO: PRECISIÓN, ROBUSTEZ Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN, UTILIZANDO ESPECTOFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA”



Presentado por:

DORIS JEANNETTE GARCÍA MENÉNDEZ

Para otorgarle el título de:

LICENCIADA EN ACUICULTURA

Guatemala, Octubre de 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

Secretaría

Licda. Norma Gil de Castillo

**Representante del Colegio de
Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Licda. Estrella de Lourdes Marroquín



El Ing. Agr. Pedro Julio García Chacón, Director del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA- después de conocer el dictamen favorable del Ing. Carlos Gordillo, Coordinador Académico, sobre el trabajo de graduación de la estudiante universitaria **Doris Jeannette García Menéndez** titulado **“Verificación del Método 968.08 AOAC a través de los Parámetros de Desempeño, Precisión, robustez y Límite de Cuantificación, utilizando Espectrofotómetro de Absorción Atómica”**, da por este medio su aprobación a dicho trabajo.
IMPRIMASE.

Guatemala, Octubre del 2,009

ID Y ENSEÑAD A TODOS

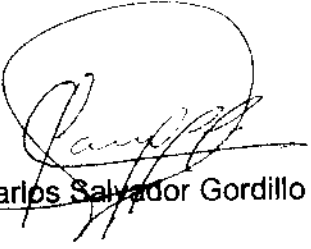
Ing. Agr. Pedro Julio García Chacón
DIRECTOR





El Coordinador Académico del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura - CEMA-, después de conocer el dictamen de los revisores Licda. Dora Carolina Marroquín Mora, Sra. Adela Pérez Cruz, y la aprobación de la Coordinadora de EPS Licda. Olga Marina Sánchez al trabajo de graduación de la estudiante universitaria **Doris Jeannette García Menéndez**, titulado "Verificación del Método 968.08 AOAC a través de los Parámetros de Desempeño, Precisión, Robustez y Límite de Cuantificación, utilizando Espectrofotómetro de Absorción Atómica", da por este medio su aprobación a dicho trabajo y autoriza su impresión.

"Id y Enseñad a Todos"


Ing. Carlos Salvador Gordillo García



Guatemala, octubre del 2009.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Al Centro de Estudios del Mar y Acuicultura por ser una institución que me ayudó en mi desarrollo profesional.

Al Laboratorio de Sanidad Acuícola por brindarme más que un área de trabajo, una experiencia inolvidable durante la elaboración de mi Ejercicio Profesional Supervisado.

Al Dr. Salomón Medina y Licda. Carolina Marroquín por brindarme su tiempo, colaboración y apoyo incondicional.

A mis catedráticos, por formarme como profesional, brindándome su tiempo, colaboración y apoyo en todo momento.

A todas las personas que han colaborado y apoyado durante mi desarrollo profesional.

ACTO QUE DEDICO

A Dios por sus infinitas bendiciones y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida profesional.

A mis padres, por ser mi motivación y apoyarme en todos los aspectos del desarrollo de mi vida, y por su amor incondicional.

A mis hermanos por ser mi compañía, mi ayuda y brindarme tanto amor en todo momento.

A mi hijo, Herardo Javier por ser lo mas especial en mi vida.

A Herardo Hernández por amarme y ser mi apoyo.

A mis familiares y amigos que me han brindado su apoyo.

RESUMEN

Estudios recientes han dado a conocer las consecuencias de consumir alimentos con alto contenido de Cobre (Cu). Este metal está presente en los alimentos y el ser humano, aunque no puede producirlos, lo absorbe; es un metal bioacumulable, lo cual provoca que se almacene en los tejidos y causando daños a la salud (Pro-cobre, 2001).

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los metales comprendidos en la tabla periódica. Este método se caracteriza por su sensibilidad y especificidad.

Mucha de la producción acuícola se destina a la exportación. Sin embargo para poder exportar productos acuícolas es necesario cumplir con las regulaciones internacionales que establecen límites permisibles de residuos potencialmente tóxicos en productos de consumo. Es por esto que se genera el interés de implementar el método 968.08 AOAC (Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence) para la determinación de Cobre (Cu) en músculo de camarón.

Sin embargo, para la funcionalidad de un método, la Oficina de Acreditación Guatemalteca –OGA- establece que cualquier método, debe cumplir con parámetros de desempeño, los cuales confirmarán que el método es eficiente para las condiciones del laboratorio.

Es por ello que en este trabajo se evaluaron los parámetros de: precisión, robustez, límite de cuantificación en el equipo AA SHIMADZU 6800 ubicado en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura siguiendo la metodología establecida por OGA donde se concluye que: a) el equipo es preciso para las condiciones del laboratorio, b) cuenta con un límite de cuantificación de 0.012, c) el método es robusto en relación a los días de análisis y para los laboratoristas el método es robusto desde 0.2 ppm.

ABSTRACT

Recent studies have shown the consequences of consuming foods high Copper contents (Cu). This metal is present in many foods. Humans, however we cannot produce it, we absorb it from food. Copper is a bioaccumulable metal that can be stored in tissues causing health damages (Pro-cobre, 2001).

Atomic absorption spectrophotometry is a technique that enables to detect and determine most metals quantitatively in the periodic chart. This method is characterized by its sensibility and specificity.

Much of the aquaculture production is destined for exportation. However to be exportable, aquaculture products have to comply and fulfill regulations that establish permissible limits of potentially harmful residues in products destined for human consumption. That is why the Laboratorio de Sanidad Acuícola of the Centro de Estudios del Mar y Acuicultura of the Universidad de San Carlos de Guatemala works in the implementation the method 968-08 AOAC (Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence) method for Copper determination (Cu) in shrimp muscle.

For a method to be functional the Guatemalan Accreditation Office – Oficina Guatemalteca de Acreditación, OGA - requires that any method fulfills performance parameters, which confirm that the method is efficient under the conditions of the laboratory, besides assuring that the service being offered is reliable.

The parameters were evaluated of: precision, robustness, limit of quantification in the team AA SHIMADZU 6800 located in the Laboratory of Sanity Acuícola of the Center of Studies of the Sea and Acuicultura following the methodology settled by OGA where you concludes that: a) the team is necessary for the conditions of the laboratory, b) it has a limit of quantification of 0.012, c) the method is robust in relation to the days of analysis and for the analysts the method is robust from 0.2 ppm.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Metales pesados	2
2.2. Cobre (Cu)	2
2.2.1. Absorción del cobre en camarones	3
2.2.2. Cobre en el humano	4
2.2.3. Peligros del consumo del Cobre	6
2.3. Espectrofotometría de Absorción Atómica	6
2.3.1. Aplicaciones analíticas de la espectrofotometría	8
2.4. Verificación de un método de análisis instrumental	8
2.5. Parámetros de desempeño	9
2.5.1. Precisión – Repetibilidad	10
2.5.2. Límite de cuantificación	11
2.5.3. Robustez	12
III. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivo Específico	13
IV. METODOLOGÍA	14
4.1. Descripción del área	14
4.2. Definición de las variables de estudio	15
4.3. Análisis e interpretación de resultados	16
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1. Precisión	21
5.2. Limite de cuantificación	23
5.3. Robustez	25

VI. CONCLUSIONES	30
VII. RECOMENDACIONES	31
VIII. BIBLIOGRAFIA	32
IX. ANEXO	35

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura No. 1. Niveles energéticos de un átomo	7
Figura No. 2 Ilustración de la exactitud y precisión.	11
Figura No. 3. Ubicación del Laboratorio de Sanidad Acuícola	14
Figura No. 4. Equipo de espectrofotometría de absorción atómica, AA SHIMADZU 6800.	15
Figura No. 5. Preparación de curva de calibración.	19
Figura No. 6. Resultados de la evaluación del parámetro precisión	23
Figura No. 7. Determinación de límite de cuantificación	24
Figura No. 8. Lecturas de cobre Robustez-Dias.	26
Figura No. 9. Robustez-Días	27
Figura No. 10. Resultados para la determinación de robustez-laboratorista	28
Figura No. 11. Comparación de las lecturas entre laboratoristas	29

INDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro No. 1.	Lecturas de músculo de camarón.	21
Cuadro No. 2.	Variables estadísticas	22
Cuadro No. 3.	Resultados para análisis de normalidad.	22
Cuadro No. 4.	Resultados para la determinación de límite de cuantificación	24
Cuadro No. 5.	Análisis estadístico	24
Cuadro No. 6.	Determinación de Robustez-Días	26
Cuadro No. 7.	Análisis estadístico Robustez-Día.	26
Cuadro No. 8.	Robustez-laboratorista	29

INDICE DE ANEXO

- Anexo No. 1.a** Método Oficial 968.08 AOAC
- Anexo No. 1.b.** Traducción del método AOAC 968.08
- Anexo No. 2** Procedimiento para la preparación de una curva de calibración
- Anexo No. 3.** Preparación de muestra para determinación de Cobre (Cu) en músculo de camarón.
- Anexo No. 4** Boleta: precisión
- Anexo No. 5** Boleta: límite de cuantificación
- Anexo No. 6** Boleta: Robustez-Día
- Anexo No. 7** Boleta: Robustez-laboratorista.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la medicina ha observado enfermedades en humanos provocadas por el consumo de alimentos con alto contenido de metales pesados, lo cual ha generado la necesidad de que las organizaciones reguladoras de la sanidad de alimentos conozcan la cantidad de metales presentes en los mismos. En este marco, se está implementando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, el método más ampliamente utilizado, durante casi medio siglo, para la determinación de trazas de metales pesados en muestras analíticas (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

La AOAC establece métodos oficiales; los cuales son implementados por los laboratorios según sus condiciones particulares de trabajo. Es por esto que el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura – CEMA- implementará el método AA 968.08 AOAC para la determinación de Cobre en músculo de camarón.

Para asegurar la funcionalidad del método, este debe ser verificado según la normativa de la OGA, la cual, establece parámetros de desempeño que deben cumplirse.

El presente trabajo trata de la verificación de los parámetros: robustez, precisión y límite de cuantificación para poder determinar si el método AA 968.08 AOAC cumple con los requisitos establecidos por OGA al ser trabajado en el equipo SHIMADZU 6800 bajo las condiciones que ofrece el laboratorio de Sanidad Acuícola.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Metales Pesados

Los metales pesados se definen arbitrariamente como aquellos metales cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua. Dichos metales se encuentran en forma natural en la corteza terrestre de manera muy concentrada, constituyendo yacimientos minerales. Algunos están en la naturaleza en grandes cantidades y se acumulan en la cadena alimenticia lo que constituye un riesgo potencial real (Coca, 2002).

Muchos metales pesados son indispensables para la vida, aunque sólo se encuentran en cantidades muy pequeñas en los tejidos del cuerpo. Sin embargo en altas concentraciones pueden ser tóxicos. La toxicidad de un metal depende de su vía de administración y del compuesto químico al que está ligado (CESCCO, UNAH, 1994). Entre los metales pesados que tienen más probabilidades de causar problemas están Cobre (Cu), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Estaño (Sn), Pb (Plomo), Vanadio (V), Cr (Cromo), Mo (Molibdeno), Mn (Manganeso), Co (Cobalto) y Ni (Niquel).

2.2. Cobre (Cu)

El Cobre es un metal maleable rojizo. Su peso atómico es 63.6 u.m.a.(Unidad de masa atómica), cuyas sales son tóxicas. Se encuentra en forma libre y en minerales como la malaquita, la coprita y la cal copirita. El Cobre es insoluble en agua, pero soluble en ácido nítrico y ácido sulfúrico caliente (Osuna; Aguirre, 2001).

La explotación del cobre no cesa de aumentar desde comienzos del siglo XX a causa de su gran utilización en la industria eléctrica, construcción, plomería, industria ferretera, fertilizantes, fungicidas, etc. El Cobre es esencial para el metabolismo del tejido conectivo, síntesis de la hemoglobina, desarrollo óseo y función nerviosa; pero existe peligro a concentraciones elevadas principalmente en el hígado (Osuna; Aguirre, 2001).

2.2.1. Absorción del cobre en camarones

Todos los metales, incluyendo los micronutrientes esenciales, son virtualmente tóxicos para los organismos acuáticos y para los seres humanos si los niveles de exposición son suficientemente altos. 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 una concentración de varios órdenes de magnitud en los macroinvertebrados. La asimilación implica la formación de complejos con sustancias orgánicas, no siendo fácilmente excretados (Scelzo, 1997).

Aunque los organismos vivos requieren de ciertas cantidades de iones metálicos para realizar eficazmente los procesos fisiológicos, un exceso de iones de metales pesados causan estrés que se manifiesta en forma subletal o causan 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).

La bioacumulación de cobre puede darse en camarones al igual que en peces y otros crustáceos. Un porcentaje del Cobre y Zinc encontrados en el músculo de estos organismos se debe a que funcionan como activadores de numerosas enzimas (metaloenzimas) presentes en la glándula digestiva de los crustáceos decápodos donde sus funciones van ligadas a varios procesos metabólicos del organismo (Tacon, 1995).

La mayor concentración de Cobre en los crustáceos decápodos se encuentra en el hepatopáncreas y en la sangre, donde forma parte del pigmento respiratorio hemocianina. El sulfato de Cobre, es un poderoso 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 considerablemente de acuerdo al nivel trófico del organismo y al estadio de su ciclo de vida (Tacon, 1995).

2.2.2. Cobre en el Humano

El Cobre es un elemento esencial en el metabolismo humano, forma eritrocitos, contribuye a la liberación del hierro en los tejidos y ayuda al desarrollo de los huesos, sistema nervioso central y tejido conjuntivo. La entrada del cobre al cuerpo está también relacionada con la presencia de otros metales. El Cobre se almacena en órganos tales como hígado, corazón, cerebro, riñón y músculo (Procobre, 2001).

El cuerpo humano no puede fabricar Cobre, de modo que debe obtenerlo de los alimentos o suplementos dietéticos. El Cobre está disponible en una amplia variedad de alimentos frescos y ligeramente procesados. Las personas dependen de alimentos con contenido de cobre para su normal funcionamiento. De lo contrario, pueden ingerir suplementos como una medida de seguridad o cuando fuese recetado por el médico (Cesco, 1994).

El Cobre en la dieta alimenticia se absorbe en el estómago y el intestino delgado y luego se distribuye a las proteínas que lo necesitan y que aparentemente poseen poca capacidad para almacenar el exceso de Cobre en el cuerpo. Normalmente alrededor del 30% de cobre ingerido es absorbido. La absorción gastrointestinal es determinada por el rango del metal en el cuerpo. En dietas bajas de cobre los niveles de absorción se muestran altos, entre 50% y 65%. El porcentaje absorbido disminuye cuando los niveles de Cobre aumentan (Procobre, 2001).

El cuerpo exige una ingesta regular de Cobre en la dieta para mantenerse sano. Distintas autoridades nacionales e internacionales han definido normas de ingesta de cobre a niveles que se consideran adecuados para mantener la salud. A continuación se enumeran algunas de estas normas de consumo, y datos de ingesta diaria en diferentes partes del mundo:

- La Organización Mundial de la Salud (2007) estima que el límite inferior del rango aceptable de ingesta oral diaria para el Cobre es de 20 mg/kg de peso corporal para los adultos y cerca de 50 mg/kg de peso corporal para lactantes. Para un adulto saludable normal (que pesa entre 50 y 70 kg), esto equivale a 1.0 a 1.4 mg/día.
- La referencia de ingesta de la población de la Unión Europea para el Cobre es de 1,1 mg/día.
- La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos –NAS, por sus siglas en inglés- emitió su primera Dosis Dietética Recomendada (RDA) para Cobre en 2001, recomendando un consumo de 0,9 mg de cobre diario para adultos; 1,0 mg para las mujeres embarazadas; y 1.3 mg para madres lactantes. La NAS también estableció un Límite Superior Tolerable de 10 mg/día.
- Según la OIE (Organización Internacional Europea), la ingesta media diaria de Cobre en adultos europeos es de entre 1.0 y 2.26 mg para los hombres y de entre 0.9 y 1.1 para las mujeres.

2.2.3. Peligros del consumo de Cobre

El cobre es indispensable para la vida, sin embargo en humanos se encuentra en cantidades pequeñas dentro de los tejidos corporales. En humanos la ingesta de dosis grandes de Cobre (Cu) genera irritación y corrosión de las mucosas, daño capilar generalizado, daño hepático y renal, e irritación del sistema nervioso central, además de provocar daños en el estado de ánimo del consumidor. Puede ocurrir una irritación gastrointestinal, además de posibles cambios necróticos en los riñones y en el hígado. Los rangos permisibles de cobre son de 1-3 microgramos/litro; mientras que en el agua los rangos de concentraciones tóxicas de Cobre para peces son de 0.01 - 1.7 ppm (Roesch, 1998).

2.3. Espectrofotometría de Absorción Atómica

El método de espectrofotometría de absorción atómica se utiliza para la determinación cualitativa y cuantitativa de la mayoría de elementos de la tabla periódica. Este equipo permite detectar las concentraciones en partes por millón (ppm), partes por billón (ppb) y porcentaje de concentración (%) (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

Las características fundamentales de este método son su rapidez, alta sensibilidad, referente a la captación de la mínima señal y selectividad en relación a la onda de longitud percibida sin interrupciones. Consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra. Los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo diferencian las técnicas y accesorios utilizados (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

Los métodos espectroscópicos se basan en la medida de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia. Los métodos de absorción están basados en la disminución de la potencia de la radiación electromagnética como consecuencia de la absorción que se produce en su interacción con el analito (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

Si se aplica energía a un átomo, se observa fácilmente los niveles energéticos de un átomo (Figura No.1), ya que absorbe la energía y un electrón externo puede ser promovido a una configuración conocida como estado excitado; dado que ese estado es inestable, el átomo retornará inmediatamente al estado fundamental, emitiendo energía. La característica de interés se refiere a la cantidad de luz absorbida por un analito, a la longitud de onda resonante, cuando pasa a través de una nube atómica. Conforme el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad de luz absorbida aumentará (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

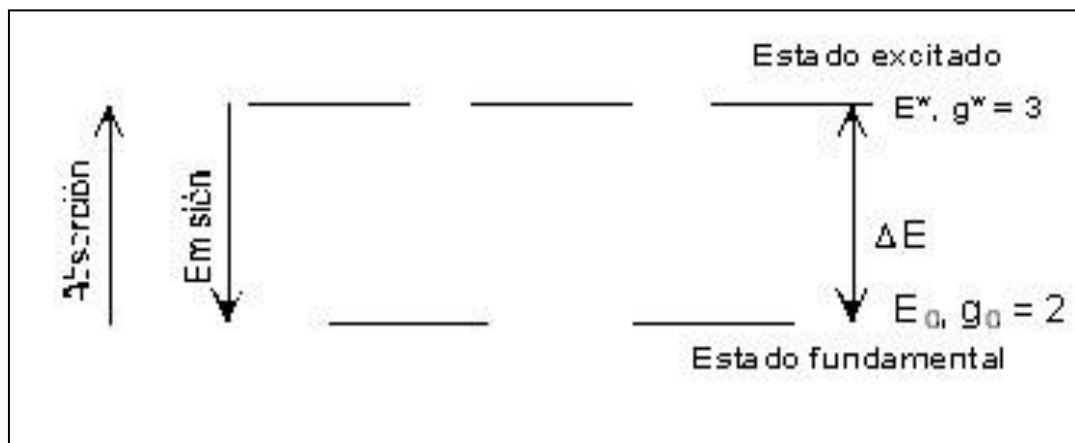


Figura No. 1. Niveles energéticos de un átomo. (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

2.3.1. Aplicaciones analíticas de la espectrofotometría

Este método tiene múltiples aplicaciones y usos, tales como:

1. Análisis Clínicos, en las áreas de toxicología de microclima laboral, bioquímica nutricional, toxicología accidental o forense.
2. Edafología, análisis de suelos.
3. Bromatología para elementos metálicos y no metálicos para alimentos en general.
4. Análisis de aguas ultra puras, tales como las empleadas en hemodiálisis.
5. Análisis ambientales de residuos peligrosos, cantidad de elementos metálicos y no metálicos. Se analizan con frecuencia la calidad del agua para consumo humano, protección de vida acuática, irrigación, consumo de ganado, pesca industrial, calidad de suelos, calidad del aire ambiental, y estándares de emisores gaseosos entre otros.
6. Industrias farmacéuticas, donde la técnica de AA tiene múltiples y variadas aplicaciones para el control de calidad de medicamentos y preparados farmacéuticos.
7. Metalurgia, determinar diversos elementos en un amplio rango de concentración.
8. Derivados del petróleo, para determinar la procedencia de los elementos presentes en los combustibles, ya sea de materia prima (crudo) o de una contaminación en el transporte o proceso en refinería.

2.4. Verificación de un Método de Análisis Instrumental

AOAC tiene estatuto de observador oficial en el Codex Alimentarius. Desde la creación de la AOAC se permite la posibilidad de la elaboración de normas internacionales para la evaluación de los alimentos y la agricultura. Debido a que la AOAC ha demostrado reconocimiento y credibilidad, todos los métodos que AOAC publica, por lo general, son aceptados en una norma del Codex. Ya que el Codex Alimentarios es reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y The Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), en representación de 168 países en todo el mundo; esto genera que los métodos AOAC sean

reconocidos al mas alto nivel en el mundo, y que sean por lo general los métodos de elección para cualquier laboratorio de ensayo (OGA-CEG, 2007).

La verificación de un método se refiere a la confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas, de que se han cumplido requisitos especificados. En el caso de metodología para análisis (o calibración), la verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto que fue especificado. La verificación es una práctica que se debe realizar de manera regular como parte del proceso de aseguramiento de la calidad de un laboratorio (OGA-CEG, 2007).

El término “verificado” se utiliza para designar el *status* método que ha sido verificado. La confirmación puede comprender acciones tales como:

- Elaboración de cálculos alternativos
- Comparación de un diseño nuevo con una especificación de un diseño similar aprobado
- Realización de ensayos/pruebas y demostraciones
- Revisión de los documentos antes de su liberación (OGA-CEG, 2007).

2.5. Parámetros de Desempeño

Al implementar una metodología de laboratorio de ensayo es necesario evaluar ciertos parámetros de desempeño del método, lo que asegura que los resultados sean relevantes en el uso rutinario del método. Los parámetros de desempeño establecidos para un laboratorio de ensayo son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, robustez, reproducibilidad y otras características relacionadas con los resultados obtenibles por el método (OGA-CEG, 2007).

Aún cuando se esté trabajando con un método normalizado, el cual se conoce que fue debidamente validado y probado, es necesario que en el laboratorio donde se aplicará, verifique que este funciona acorde a sus especificaciones, en sus condiciones propias de trabajo. El proceso de verificación del método debe llevarse a cabo ya que los métodos analíticos implican procesos complejos, y por ello son susceptibles al error humano, por lo que siempre es necesario verificar que el trabajo en el laboratorio es ejecutado correctamente (OGA-CEG, 2007).

2.5.1. Precisión - Repetibilidad

Se conoce como el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. Dicho de otra forma, es la cercanía entre resultados obtenidos exactamente de la misma manera. En general, la precisión de una medida se determina con facilidad, simplemente al repetir la medida en muestras duplicadas (OGA-CEG, 2007).

La precisión es la capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones. Esta cualidad debe evaluarse a corto plazo. También se le conoce como la concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma muestra, efectuadas con la aplicación de la totalidad de las condiciones siguientes:

- Mismo método de prueba o análisis
- Mismas características del instrumento de medición
- Mismas condiciones de uso
- Repetición en períodos cortos
- Misma muestra (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005)

La precisión se confunde fácilmente con exactitud (cercanía de la medida al valor aceptado o verdadero), la Figura No. 2 ayuda a aclarar ambos conceptos, dando un ejemplo de los datos en una diana. Explica la posibilidad de tener resultados muy precisos (arriba a la derecha) con una media con una gran inexactitud y una media exacta (abajo a la izquierda) con datos imprecisos.

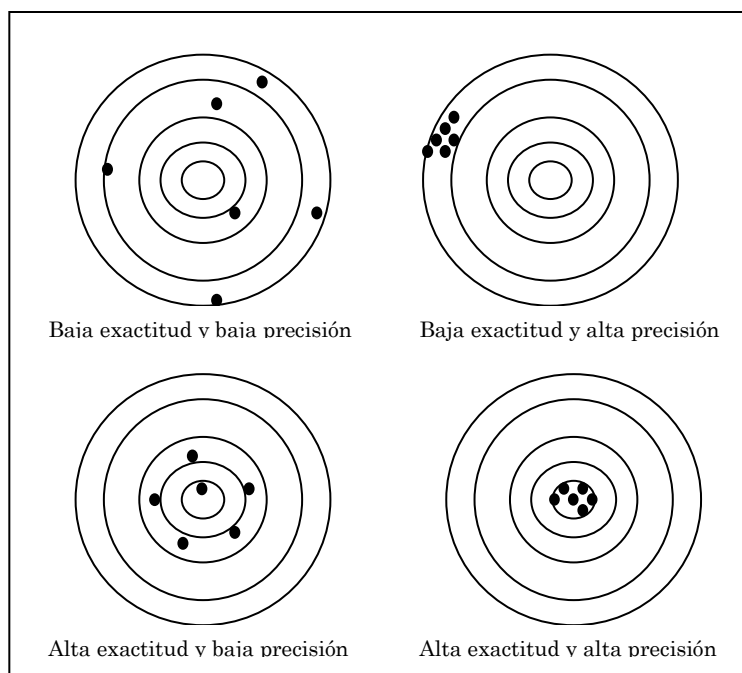


Figura No.2. Ilustración de la exactitud y precisión. (Trabajo de campo, 2008).

2.5.2. Límite de Cuantificación

Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas. Corresponde a la cantidad o concentración del analito a partir de la cual es confiable realizar determinaciones cuantitativas (OGA-CEG, 2007).

2.5.3. Robustez

Es la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. Provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales. En algunas disciplinas es considerado sinónimo de resistencia o fortaleza (OGA-CEG, 2007).

Se conoce como resistencia o fortaleza a la estabilidad del resultado producido cuando hay variaciones en los pasos del método. Se expresa normalmente como la falta de influencia de variables operacionales y ambientales en los resultados del método analítico. Es una medición de reproducibilidad de los resultados, bajo la variación de condiciones normalmente realizadas (OGA-CEG, 2007).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Verificar el método 968.08 AOAC, para la determinación de Cobre en el músculo de camarón en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar el método 968.08 AOAC a través de los parámetros de desempeño: precisión-repetibilidad, límite de cuantificación y robustez.
- Determinar si los parámetros evaluados cumplen con los criterios establecidos por OGA para la verificación del método de análisis.
- Protocolizar el proceso funcional del método para su fácil aplicación y publicación.

IV. METODOLOGIA

4.1. Descripción del área

El método 968.08 AOAC fue implementado y verificado en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA- ubicado dentro en el edificio T-14 de la Universidad de San Carlos de Guatemala –USAC- (Figura No. 3). Este laboratorio cuenta con el equipo de espectrofotometría de absorción atómica AA SHIMADZU 6800; además de las instalaciones, material y equipo necesario para la realización de este estudio (Figura No.4).

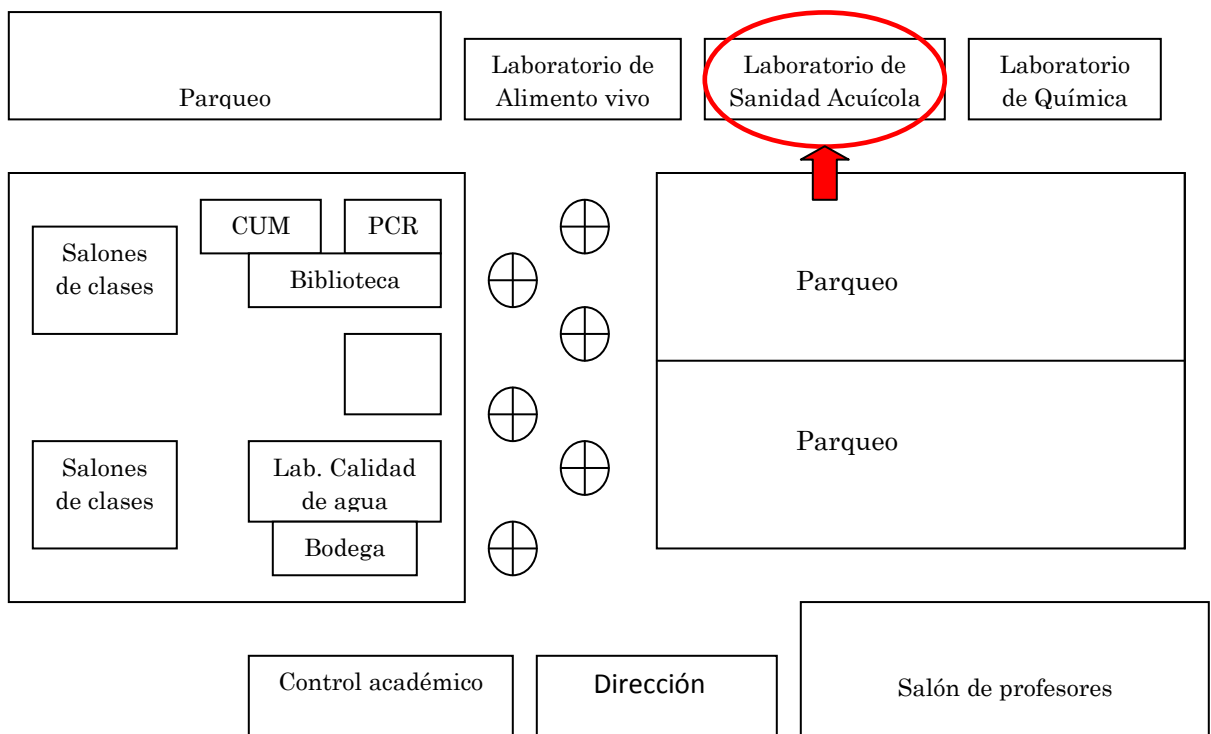


Figura No. 3. Ubicación del Laboratorio de Sanidad Acuícola. (Trabajo de campo, 2008).



Figura No. 4. Equipo de espectrofotometría de absorción atómica, AA SHIMADZU 6800. (Trabajo de campo, 2008).

4.2. Definición de las variables de estudio

La AOAC presenta varios métodos normalizados, los cuales pueden ser utilizados por otros laboratorios de ensayo para estudiar un analito en común. Para la implementación del método en las condiciones del laboratorio se utilizó como referencia el método 968.08 (Anexo No. 1) establecido por la AOAC, realizando algunas variaciones aplicables al equipo de espectrofotometría de absorción atómica AA SHIMADZU 6800.

Al implementar el método, se verificó su funcionalidad con los siguientes parámetros de desempeño:

- Precisión-Repetibilidad
- Limite de cuantificación
- Robustez (variando el día y laboratoristas)

4.3. Análisis e Interpretación de Resultados

Se inició realizando una curva de calibración (Anexo No. 2) con el metal a identificar. Los resultados se verificaron de acuerdo a los criterios del parámetro evaluado:

- **Precisión y Repetibilidad**

Para la evaluación de precisión se trabajó con submuestras de una misma muestra homogénea de camarón, bajo las mismas condiciones de operación (temperatura, cristalería, equipo de apoyo).

La muestra de camarón se preparó de acuerdo a las especificaciones del método, obteniendo 6 sub-muestras de 10 gramos cada una, las cuales fueron incineradas (mufla) y digeridas individualmente en un crisol de 50ml, bajo las mismas condiciones (Anexo No. 3).

Cada sub-muestra se filtró y aforó en un balón de 50ml. Cada submuestra se colocó en el automuestreador del equipo, para iniciar su lectura. Cada sub-muestra se analizó 6 veces; con la finalidad de verificar que la concentración obtenida en cada una de las lecturas era similar entre sí, evitando que los valores entre ellos variaran significativamente de la media con un 95% de nivel de confianza. Los resultados de las sub-muestras fueron registrados en la boleta (Anexo No. 4).

Con las lecturas obtenidas en el equipo de espectrofotometría de absorción atómica se calcularon los siguientes parámetros de dispersión: media, desviación estándar, coeficiente de variación, intervalo de confianza. Las fórmulas de cálculo de estos parámetros son:

- Media

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

Donde:

μ = Media

$a1$ = primer dato obtenido

an = último dato obtenido

n = sumatoria de datos

- Desviación estándar

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

Donde:

S = Desviación estándar

$\mu i - \mu T$ = media de la muestra ó población

n = muestra

- Varianza

$$V = S^2$$

Donde:

S = Desviación estándar

- Límite de error

$$LE = Z \sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

Donde:

$Z = 1.96$ (95 % de confianza)

S^2 = Varianza

n = número de muestra

- Intervalo de confianza

$$IC = \mu \pm LE$$

Donde:

μ = Media

LE = Límite de error

El criterio de aceptación fue establecido de acuerdo al límite de confianza de 95% (OGA-CEG, 2007).

- Límite de Cuantificación:

Para documentar el trabajo se leyeron cinco submuestras de una muestra con valor conocido (0 ppm) en balones aforados de 100 ml. Se llevaron a cabo 6 repeticiones para cada una de las submuestras y se estimó la precisión de acuerdo a la metodología establecida anteriormente. El límite de cuantificación se evaluó a través de la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Los resultados fueron registrados en la boleta que se presenta en el Anexo No. 5.

- Robustez

Se evaluaron las variables: días y laboratoristas. Para la variable días, se preparó una muestra (solución madre de estándar de Cobre a 100 ppm) de la cual se tomaron seis sub-muestras con valores conocidos de: 0 ppm, 0.2 ppm, 0.4 ppm, 0.6 ppm, 0.8 ppm, 1 ppm (Figura No. 5) cada una en un balón aforado de 100 ml. Estas muestras se analizaron con su réplica en el equipo por 4 días consecutivos, Y se determinó si existía alguna variación en la concentración de acuerdo al día de análisis. Con las lecturas obtenidas se calculó: media, desviación estándar, coeficiente de variación.

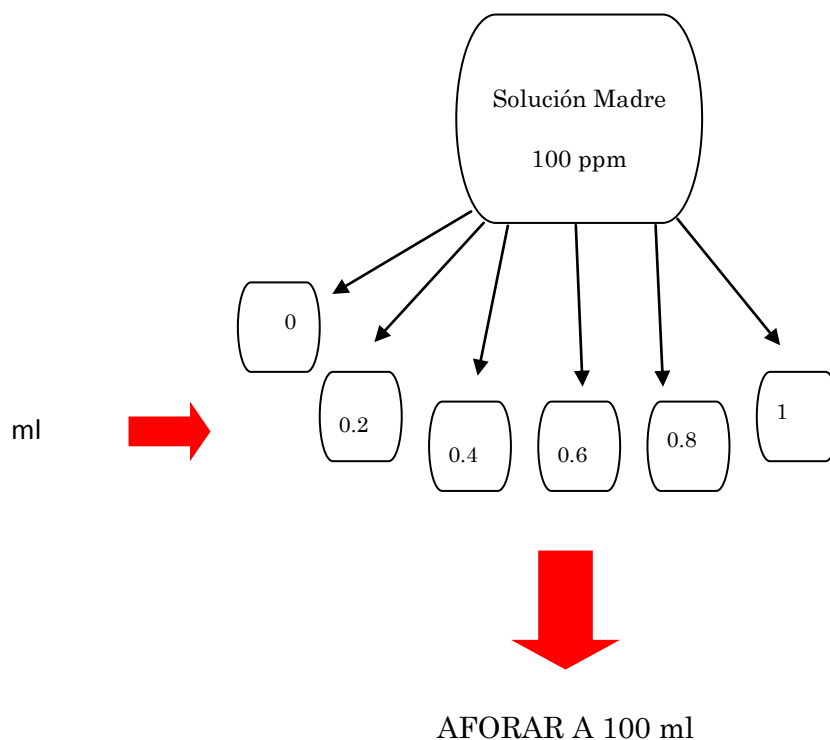


Figura No. 5. Preparación de curva de calibración. (Trabajo de campo, 2008.)

Los resultados de estas lecturas fueron registrados en la boleta que se presenta en el Anexo No. 6.

De la misma manera, se llevó a cabo la verificación de la robustez con la variable laboratorista. Donde se realizó una muestra por laboratorista (solución madre de estándar de Cobre a 100 ppm) de la cual se tomaron seis sub-muestras con valores conocidos (0 ppm, 0.2 ppm, 0.4 ppm, 0.6 ppm, 0.8 ppm, 1 ppm), (ver Figura No. 5). Las muestras fueron analizadas cuatro veces cada una, bajo las mismas condiciones ambientales y con el mismo equipo para determinar si existían variaciones significativas al calcular: media, desviación estándar, y coeficiente de variación.

Los datos obtenidos de este análisis fueron registrados en la boleta (Anexo No. 7).

El criterio de aceptación para ambas variables se basó en que los resultados obtenidos fueran precisos ó imprecisos durante los cuatro días con un límite de confianza del 95% (OGA – CEG, 2007).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Precisión

Los resultados de cada repetición son diferentes en absorbancia, ya que tienen variaciones a partir del segundo decimal, sin embargo, es permitido tener un 5% de error entre repeticiones de la misma muestra; las lecturas de camarón (Cuadro No. 1) no sobrepasan este límite, por lo que no existe relevancia entre la variación mínima que ocurre entre cada repetición; determinando esto como un error sistemático provocado por irregularidades en el equipo de Absorción Atómica (Miller, NJ; Miller JC).

Cuadro No. 1. Lecturas de músculo de camarón.

	CONCENTRACIÓN					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Rep. 1	2.7050	2.6964	2.5406	2.3871	2.5774	2.1989
Rep. 2	2.6798	2.6668	2.5334	2.3655	2.5479	2.1687
Rep. 3	2.6740	2.6855	2.5140	2.3474	2.5500	2.1687
Rep. 4	2.6740	2.6740	2.5089	2.3633	2.5536	2.1751
Rep. 5	2.6740	2.6733	2.5089	2.3525	2.5327	2.1672
Rep. 6	2.6733	2.6704	2.5154	2.3510	2.5421	2.1651

Fuente. Trabajo de campo, 2008.

Con los resultados obtenidos, se realizó el análisis de cada muestra empleando las variables estadísticas definidas en OGA necesarias para determinar la precisión del método (Cuadro No. 2).

Cuadro No. 2. Variables estadísticas.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
μ	2.68002	2.67773	2.52020	2.36113	2.55062	2.17395
S	0.01247	0.01110	0.01347	0.01459	0.01502	0.01267
IC (+)	2.69000	2.68657	2.53092	2.37275	2.56257	2.18404
IC (-)	2.67004	2.66890	2.50948	2.34952	2.53866	2.16386
LE	0.00998	0.00883	0.01072	0.01161	0.01195	0.01009
V	0.00003	0.00002	0.00003	0.00004	0.00004	0.00003
LE	0.00998	0.00888	0.01078	0.01167	0.01202	0.01014

Fuente. Trabajo de campo, 2008. μ = media; S= desviación estándar, IC= intervalo de confianza; += límite superior del intervalo de confianza; -= límite inferior del intervalo de confianza; LE= límite de error; V= varianza.

Estas medidas fueron evaluadas para obtener los errores relativos para comparar la precisión de los resultados que tienen diferentes unidades o magnitudes. Los resultados obtenidos en los muestreos fueron tomados como unidades simples para calcular la normalidad y calcular así los límites superiores, medios e inferiores (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Resultados para análisis de normalidad.

MEDIA	1.5774
DESVIACIÓN ESTANDAR	0.32590348
NORMALIDAD	0.97771045
Límite superior	2.5551
Límite inferior	0.5997

Fuente. Trabajo de campo, 2008.

Esto indica que si las concentraciones de cobre se distribuyen normalmente donde el 95% de los valores entran dentro de dos desviaciones de la media; por lo que cerca del 95% caería en el intervalo de 2.5551 a 0.5997 (Figura No. 6), indicando que el método es preciso al trabajarlo en las condiciones que presenta el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA.

Los resultados obtenidos en cuanto a la precisión se encuentran dentro de los niveles superior e inferior de confianza (Figura No. 6), confirmando que existe concordancia entre los valores numéricos de las 6 muestras trabajadas en igualdad de condiciones.

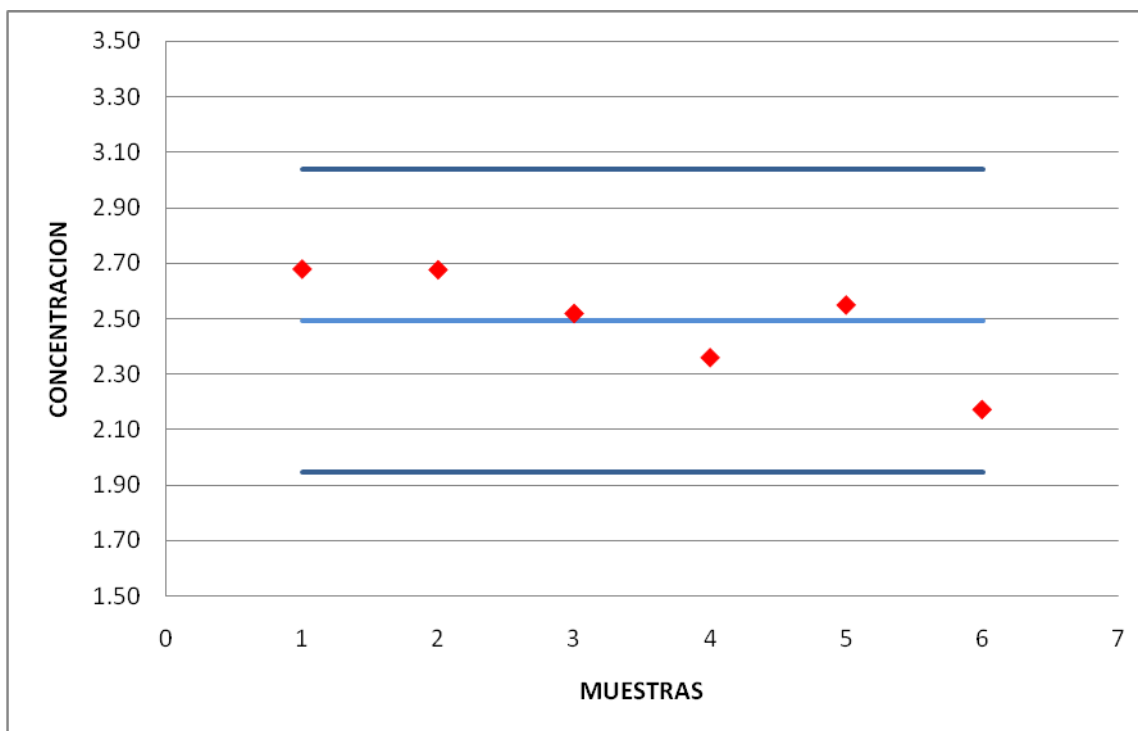


Figura No. 6. Resultados de la evaluación del parámetro precisión. (Trabajo de campo, 2008).

5.2. Límite de cuantificación

El Laboratorio de Sanidad Acuícola para poder garantizar la certeza de los resultados de los análisis debe determinar el límite de cuantificación con el cual se muestra la concentración mínima detectable sin interferencias del equipo para el método y el metal analizado; es por ello que se realizó la lectura de blancos (Cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Resultados para determinación de límite de cuantificación.

	BLANCO 1	BLANCO 2	BLANCO 3	BLANCO 4	BLANCO 5
Rep. 1	0.0076	0.0109	0.0083	0.0076	0.0031
Rep. 2	0.0083	0.0129	0.0076	0.007	0.007
Rep. 3	0.0096	0.0135	0.0083	0.0089	0.0005
Rep. 4	0.007	0.0122	0.0063	0.0102	0.0063
Rep. 5	0.005	0.0089	0.0089	0.0142	0.0083
Rep. 6	0.0057	0.0116	0.0129	0.0109	0.0057

Fuente: Trabajo de campo, 2008. Datos reportados en absorbancia.

Se realizó el análisis estadístico en donde se tomó la absorbancia mayor detectada y determinada como el límite de cuantificación (Cuadro No. 5). Se detectó interferencia posiblemente por el ruido del equipo y las alteraciones en el haz de luz a la longitud de onda específica para la determinación de cobre (Cu) (Skoog; West; Holler; Crouch, 2005).

El análisis de límite de cuantificación permitió establecer que la menor concentración cuantificable de cobre sin interferencia con el que cuenta el Laboratorio de Sanidad Acuícola utilizando el método AA 968.08 AOAC es de 0.012 ppm (Figura No. 7)

Cuadro No. 5. Análisis estadístico.

						μ
μ	0.007	0.012	0.009	0.010	0.005	0.009
S	0.00169	0.00164	0.00223	0.00262	0.00286	0.002
CV	23.45537	14.03901	25.63654	26.69494	55.46401	29.058

Fuente. Trabajo de campo, 2008. μ = media; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación

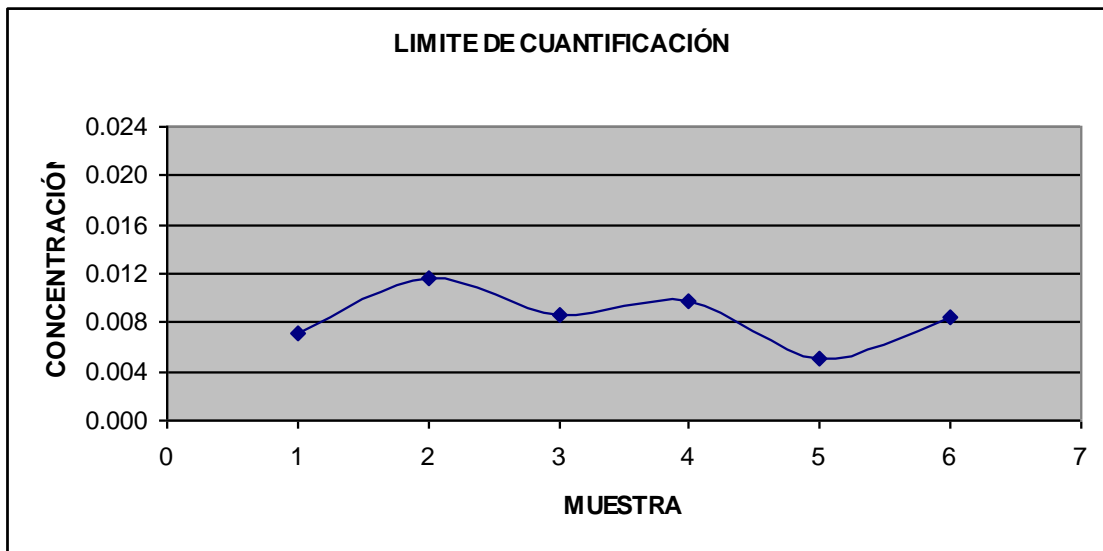


Figura No. 7. Determinación de límite de cuantificación. (Trabajo de campo, 2008).

5.3. Robustez

Para la evaluación de la robustez, se consideraron dos variables de estudio:

- *Días*

La importancia de la determinación de este parámetro consiste en poder brindar a los consumidores resultados verificables al observar las variaciones de concentración de analito en las muestras en el transcurso de los días.

Existe variación en el segundo decimal (Cuadro No. 6), aunque no es mayor que el 5% que el primero por lo que se consideran como error sistemático aceptable para el método (Figura No. 8).

Cuadro No. 6. Determinación de Robustez-Días.

	CONCENTRACIÓN					
	MUESTRA 1 0 ppm	MUESTRA 2 0.2 ppm	MUESTRA 3 0.4 ppm	MUESTRA 4 0.6 ppm	MUESTRA 5 0.8 ppm	MUESTRA 6 1 ppm
DIA 1	0.0027	0.1907	0.3694	0.5859	0.7588	0.9980
DIA 2	0.0026	0.1673	0.3492	0.5325	0.7071	0.9255
DIA 3	0.0044	0.1632	0.3421	0.5296	0.6979	0.9181
DIA 4	0.0034	0.1736	0.3394	0.5254	0.7003	0.9192

Fuente. Trabajo de campo, 2008.

Cuadro No. 7. Análisis estadístico Robustez-Día.

	MUESTRA 1 0 ppm	MUESTRA 2 0.2 ppm	MUESTRA 3 0.4 ppm	MUESTRA 4 0.6 ppm	MUESTRA 5 0.8 ppm	MUESTRA 6 1 ppm
μ	0.0032	0.1737	0.3500	0.5433	0.7160	0.9402
S	0.0008	0.0121	0.0136	0.0285	0.0288	0.0387
CV	0.2614	0.0698	0.0388	0.0525	0.0402	0.0412

Fuente: Trabajo de campo, 2008. μ = media; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación.

Se graficaron cada una de las concentraciones, en donde se observa diferencias provocadas por el ruido e interferencias del equipo (Figura No. 8), sin embargo se mantienen dentro del rango menor del 5% de variación. Es importante mencionar que la mayor diferencia de concentraciones ocurren durante el primer día de análisis ya que son concentraciones frescas, mientras que después del segundo día se mantienen estables.

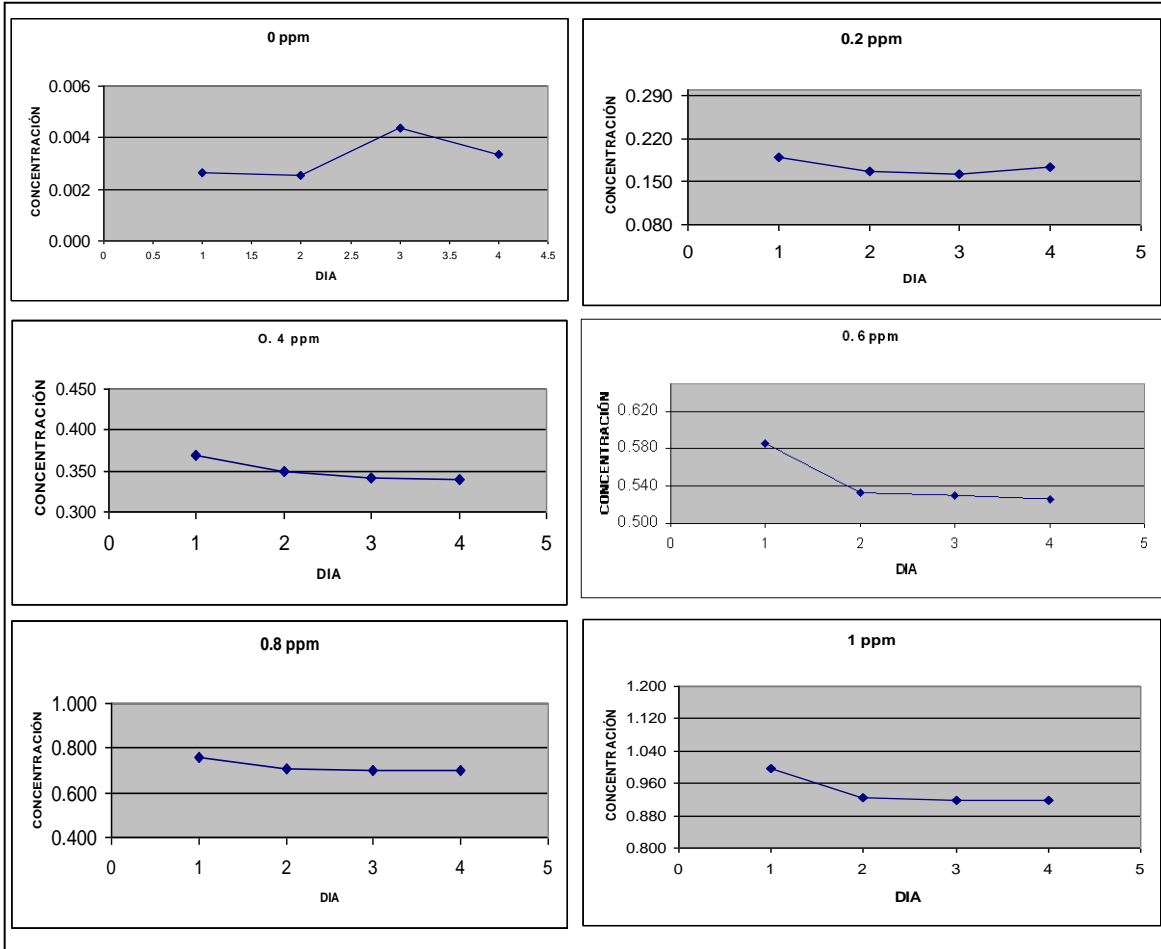


Figura No. 8. Lecturas de cobre Robustez-Días. (Trabajo de campo, 2008).

Con la finalidad de obtener una mejor apreciación de las variaciones en las concentraciones durante los cuatro días, se unificaron las graficas (Figura No. 9). Como se aprecia en la figura solamente en el primer día existen variaciones en las lecturas de concentración aunque son pequeñas, demostrando que el método es robusto en relación a los días.

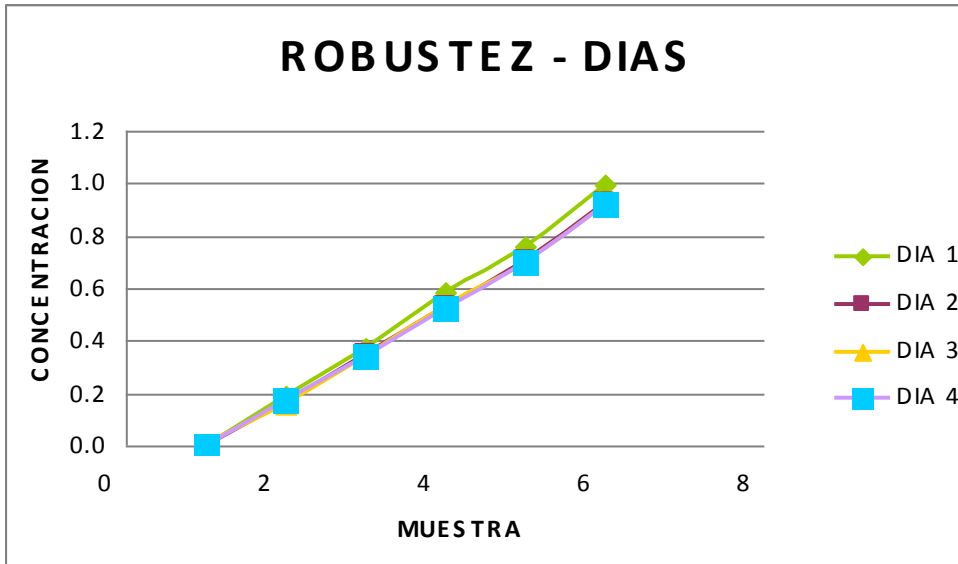


Figura No. 9. Robustez -Días. (Trabajo de campo, 2008).

- *Laboratorista*

Los análisis deben comprobarse entre los laboratoristas que utilizan el equipo con frecuencia, para conocer la precisión del equipo y si existen factores que alteren los datos entre laboratorista, ya que se espera sean similares.

Los resultados de las lecturas para cada laboratorista (Cuadro No. 8); estos resultados fueron graficados para su observación y análisis (Figura No. 10)

Cuadro No. 8. Robustez-laboratorista.

LABORATORISTA 1						
	MUESTRA 1 0 ppm	MUESTRA 2 0.2 ppm	MUESTRA 3 0.4 ppm	MUESTRA 4 0.6 ppm	MUESTRA 5 0.8 ppm	MUESTRA 6 1 ppm
DIA 1	0.0027	0.1907	0.3694	0.5859	0.7588	0.9980
DIA 2	0.0026	0.1673	0.3492	0.5325	0.7068	0.9255
DIA 3	0.0044	0.1632	0.3421	0.5296	0.6979	0.9181
DIA 4	0.0034	0.1736	0.3394	0.5254	0.7003	0.9192
μ	0.0032	0.1737	0.3500	0.5433	0.7160	0.9402

LABORATORISTA 2						
	MUESTRA 1 0 ppm	MUESTRA 2 0.2 ppm	MUESTRA 3 0.4 ppm	MUESTRA 4 0.6 ppm	MUESTRA 5 0.8 ppm	MUESTRA 6 1 ppm
DIA 1	0.0050	0.1219	0.3894	0.5543	0.7430	0.9381
DIA 2	0.0021	0.1114	0.3513	0.5080	0.6845	0.8567
DIA 3	0.0064	0.1079	0.3449	0.5099	0.6775	0.8460
DIA 4	0.0105	0.1070	0.3528	0.5215	0.7086	0.8818
μ	0.0060	0.1120	0.3596	0.5235	0.7034	0.8807

Fuente: Trabajo de campo, 2008. μ = Media.

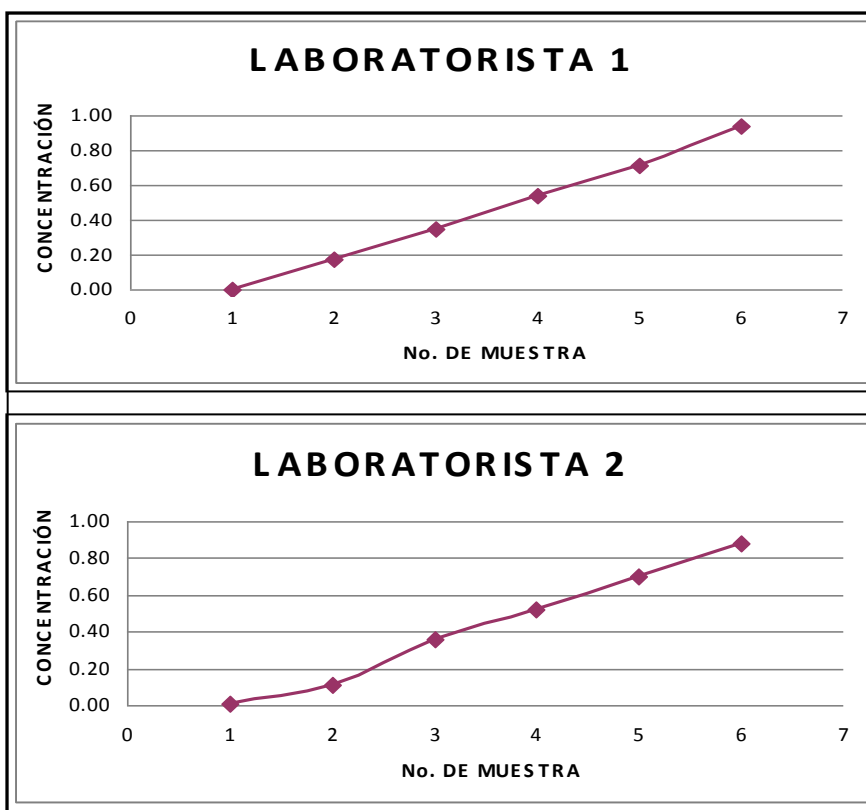


Figura No. 10. Resultados para determinación de robustez-laboratoristas. (Trabajo de campo, 2008).

De la misma manera se unificaron las gráficas para observar con claridad en que concentraciones es robusto el método en relación al laboratorista (Figura No. 11).

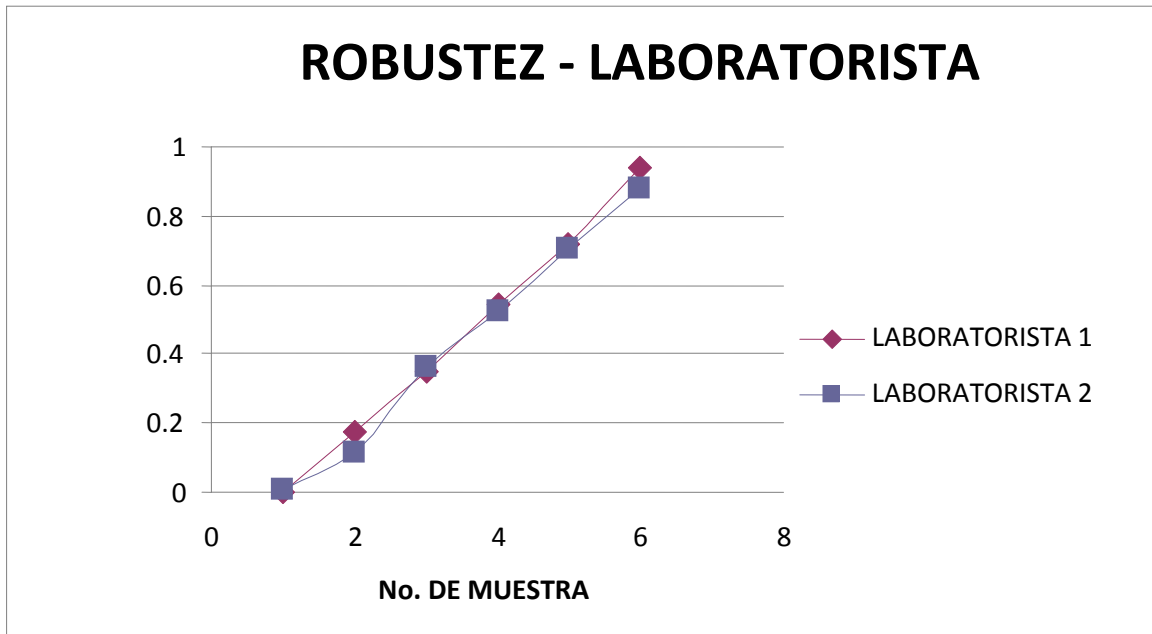


Figura No. 11. Comparación de las lecturas entre laboratoristas. (Trabajo de campo, 2008).

La diferencia en las lecturas obtenidas en la concentración de 0.2 ppm es de 30% entre cada uno; mientras que para la concentración 1 ppm existe una variación del 5%, por lo que se concluye que a partir de 0.2 ppm el método es robusto entre laboratoristas.

La variación en la lectura de la concentración de 0.2 ppm ocurre por errores de pipeteo, ya que no se cuenta con pipetas electrónicas, por lo que la precisión en el pipeteo es baja en concentraciones pequeñas.

VI.CONCLUSIONES

- El método AA 968.06 AOAC cumple con los requisitos de precisión según las condiciones de trabajo que presenta el Laboratorio de Sanidad Acuícola y el equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica Shimadzu 6800.
- El Equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica con el que cuenta el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA cuantifica sin interferencias hasta 0.012 de absorbancia para determinación de cobre en método de llama AA 968.06 AOAC.
- El método es robusto en relación a días de trabajo para el método AA 968.06 AOAC en condiciones y con el equipo que cuenta el Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA.
- Entre laboratoristas existe una variación en 0.2 de absorbancia provocado por errores en el pipeteo, sin embargo, se concluye que el método es robusto para este parámetro a partir de 0.2 ppm, bajo las condiciones y equipo del Laboratorio de Sanidad Acuícola del CEMA.

VII. RECOMENDACIONES

- Para obtener resultados mas precisos es necesario utilizar pipetas electrónicas ya que se tiene mayor exactitud en las mediciones.
- Implementar y verificar nuevos métodos para la determinación de metales pesados, con la finalidad de ofrecer mayores opciones a entidades interesadas en obtener este servicio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Chavarías, M. 2005. Estrategia europea para alimentos contaminados (en línea). España, Consumer Erokí. Consultado 24 may 2008. Disponible en <http://www.consumaseguridad.com/ciencia-y->
3. Coca Cebollero, P; Rosique Jiménez, J. 2002. Ciencia de materiales: teoría-ensayos-tratamientos. México, Pirámide. 253 p.
4. 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.
5. INIA-S/NE (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, VE); Instituto Universitario de Tecnología Cumana. Venezuela. 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.
6. 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.

7. Miller, J; Miller, J. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 ed. España: Prentice-Hall. 286 p.
8. Murai, T; Andrews, JW; Smith, RG. 1981. Effects of dietary copper on channel catfish. *Aquaculture*, 22: 353 – 357.
9. Océano. 2002. Diccionario enciclopédico: Océano Uno color. Barcelona, Edición del Milenio. 1728 p.
10. OGA-CEG-016 (Oficina de Acreditación de Guatemala). 2007. Política de selección y validación de métodos de ensayo. Guatemala, OGA. 29 p.
11. Osuna Flores, I; Aguirre García, F. 2001. Cobre, amigo y adversario de la salud humana (en línea). México, Centro Universitario de la Costa Sur de la Universidad de Guadalajara. Consultado 8 may 2008. Disponible en <http://www.jornada.unam.mx/2001/12/31/cien-cobre.html>
12. Procobre, CL. ¿Cómo obtiene el cobre el cuerpo humano? (en línea). Chile, Procobre. Consultado 9 may 2008. Disponible en http://www.procobre.org/procobre/acerca_del_cobre/pu_salud_01.html -
13. Roesch, RR. 1998. Determinación de algunos metales ecotóxicos y hábitos alimenticios del caracol *Pomacea*, sp del lago de Amatitlán. Tesis Lic. en Acuicultura. Guatemala, USAC. 125 p.
14. 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.
15. Sena, S; Trevor, A. 1995. Fish nutrition in aquaculture. Malaysia, Chapman & Hall Aquaculture Series 1. 179 p.

16. Skoog, D; West, D; Holler, F; Crouch, S. 2005. Fundamentos de química analítica. 8 ed. México, Thompson. p. 851 – 884, 1057.

17. Tacon Albert, GJ. 1995. Ictiopatología nutricional: signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. Roma, FAO. p. 15-21 p.

IX.ANEXO

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 solutions.—Prepare stock solutions as in 965.09B(b), (c), and (e)–(g) (see 2.6.01), and dilute aliquots with 0.1–0.5M 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 test portion in well-glazed porcelain dish. Start in cold furnace, bring to 550°C, and hold 4 h. Cool, add 10 mL 3M HCl, cover with watch glass, and boil gently 10 min. Cool, filter into 100 mL volumetric flask, and dilute to volume with H₂O. Subsequent dilutions with 0.1–0.5M HCl may be necessary to bring test solutions into analytical range, except for Ca. Final Ca dilution must contain enough La solution, 965.09B(d) (see 2.6.01), to provide 1% La 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 test portion 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 0.1–0.5M HCl may be necessary to bring test solutions into analytical range, as in (a).

E. Determination and Calculations

See 965.09D–E (see 2.6.01).

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

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)

Revised: March 1996

AOAC Método Oficial 968.08
Minerales en Alimento Animal y Comida de Mascotas
Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica
Primera Acción 1968
Última Acción 1969

PREVENCIÓN: Vea el Apéndice B, notas de seguridad en uso de AAS

A. Aparato

Espectrofotometro de Absorción Atómica. –Observar 965.05 A (mirar 2.6.01).

B. Parámetros de Operación

Vea tabla 965.09B (2.6.01), excepto el uso combustible-rico-aire-C₂H₂ la llama para Ca y Mg, y los rangos de operación para ug la solución del elemento en ml es: Ca 5-20, Cu 2-20, Fe 5-20, Mg 0.5-2.5, Mn 5-20 y Zn 1-5.

C. Reactivos

Pueden utilizarse soluciones comercialmente preparadas.

(a) Solución estándar de calcio. - Prepare como en 965.09 B (a) (mirar 2.6.01)

(b) Soluciones estándares de cobre, hierro, magnesio, manganeso y cinc. - Prepare la solución stock como en 965.09 B (b), (c), y (e) - (g) (mirar 2.6.01), y diluya los alícuota con 0.1-0.5 M HCL para hacer 4 soluciones normales de cada elemento dentro del rango de determinación.

D. Preparación de la Muestra

(a) Cenizas secas (no aplicable para minerales-mezclar los alimentos). - Las cenizas obtenidas de 2-10 g de muestras en un crisol porcelana. Empiece el horno o mufla frío, lleve a 550°C, y mantenga por 4 horas. Enfríe, agregue 10 ml 3 M HCL, cubra, e hierva 10 min suavemente. Enfríe, fíltrese en 100 ml el frasco volumétrico, y diluya al volumen con H₂O. Las diluciones subsecuentes con 0.1 - 0.5 M HCL puede ser necesario dejar las soluciones en el rango analítico, salvo en Ca. La última dilución de Ca debe contener suficiente solución, 965.09 B(d) (mirar 2.6.01), para proporcionar a 1% la concentración, después diluir con H₂O.

(b) Digestión Húmeda. - Procede como en 935.13 A(a) (mirar 4.8.04), agregando 25 ml HNO₃ para cada 2.5 gr de muestra, diluyendo a 100 ml con H₂O. La digestión puede hacerse a calor bajo en un crisol, usando un beaker de 600 ml cubierto con un vidrio de reloj. Las diluciones subsecuentes con 0.1-0.5 M HCL pueden ser probadas en el rango analítico como en (a).

E. Determinación y Cálculos

Observar en 965.09 D-E (mirar 2.6.01).

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

CAS-7440-70-2 (calcio)

CAS-7440-50-8 (cobre)

CAS-7439-89-6 (hierro)

CAS-7439-96-5 (manganeso)

CAS-7440-66-6 (zinc)

Revisado: Marzo 1996.

Preparación de Solución Madre

- ✓ Tomar 10ml de Estándar de cobre (Cu) con una pipeta volumétrica y colocarlo en un balón aforado de 100ml
- ✓ Aforar con agua destilada el balón de 100 ml

Preparación de 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

Preparación de la concentración 0.2ppm:

- ✓ Tomar 0.2ml de la solución madre con una pipeta 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

Preparación de la concentración 0.4ppm:

- ✓ Tomar 0.4ml de la solución madre con una pipeta 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

Preparación de la concentración 0.6ppm:

- ✓ Tomar 0.6ml de la solución madre con una pipeta 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

Preparación de la concentración 0.8ppm:

- ✓ Tomar 0.8ml de la solución madre con una pipeta 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

Preparación de la concentración 1ppm:

- ✓ Tomar 1ml de la solución madre con una pipeta 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. 2. Procedimiento para la preparación de una curva de calibración.

PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA DETERMINACIÓN DE COBRE (Cu) EN MUSCULO DE CAMARÓN

Manejo de la muestra

Luego de colectar la muestra se coloca en bolsas herméticamente selladas para su conservación; logrando mantener una temperatura de 4°C o refrigerada durante su traslado y almacenamiento. Toda muestra debe ser identificada con: fecha de la muestra, condiciones en la toma de muestra, hora de toma de muestra, responsable de la toma de muestra.

Cantidad de muestra

Para poder realizar el análisis de cobre se debe ingresar una muestra de 1 libra al laboratorio; este peso incluye al organismo completo con cabeza y caparazón. De esta muestra se logrará determinar la cantidad de cobre presente en ella, así como su réplica y conservación de muestra para control de trazabilidad.

Preparación de la Muestra

La muestra debe ser recibida con las especificaciones dadas con anterioridad, para que no exista una alteración en la determinación del análisis.

De la muestra se elimina el caparazón y cabeza, dejando solamente el músculo para la preparación de la muestra. Por medio de un procesador de alimentos se logra la homogenización de la muestra, logrando que se lleve a cabo el análisis con mayor precisión; dejando la muestra en partículas muy pequeñas para su análisis.

Se toman dos crisoles, en cada uno se pesa 3 gramos de la muestra. Cada crisol deberá ser identificado, con el número de muestra para evitar confusiones posteriores. La muestra restante es colocada en una bolsa hermética, debidamente identificada para próximos análisis, si fuere necesario y almacenarlos en la refrigeradora.

Los crisoles son trasladados a la mufla; esta se programa para que por medio rampas se llegue a una temperatura de 550°C y permanezca en ella por 4 horas, logrando la incineración de la muestra. Al crisol se le aplicará un poquito de agua destilada, con la finalidad que las cenizas se humedezcan y se separe de las paredes del crisol.

Se añade 10ml de ácido nítrico al 65% al crisol, posteriormente se pone a calentar sin que se formen burbujas por media hora.

Dejar enfriar el crisol con la muestra.

Aparte en un balón aforado se coloca un embudo con un filtro en la boquilla, donde se agrega la muestra pasando por un filtro de 4 micras para pasar la muestra pura. Después se afora a 50 ml con agua destilada.

Anexo No. 3. Preparación de muestra para determinación de Cobre (Cu) en músculo de camarón.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA –CEMA-
LABORATORIO DE SANIDAD ACUÍCOLA

Parámetro de desempeño: Precisión

Laboratorista: _____ Fecha: _____ Hora: _____

No.	<input type="checkbox"/> Rep. 1	<input type="checkbox"/> Rep. 2	<input type="checkbox"/> Rep. 3	<input type="checkbox"/> Rep. 4	<input type="checkbox"/> Rep. 5	<input type="checkbox"/> Rep. 6
1						
2						
3						
4						
5						

Anexo No. 4. Boleta: precisión. Donde: [] se refiere a la concentración obtenida para cada repetición y Rep. a las repeticiones.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA –CEMA-
LABORATORIO DE SANIDAD ACUÍCOLA

Parámetro de desempeño: Límite de cuantificación

Laboratorista: _____ Fecha: _____ Hora: _____

No.	<input type="checkbox"/> Rep. 1	<input type="checkbox"/> Rep. 2	<input type="checkbox"/> Rep. 3	<input type="checkbox"/> Rep. 4	<input type="checkbox"/> Rep. 5	<input type="checkbox"/> Rep. 6
1						
2						
3						
4						
5						

Anexo No. 5. Boleta: límite de cuantificación. Donde [] se refiere a concentración y Rep. a repeticiones.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA –CEMA-
LABORATORIO DE SANIDAD ACUÍCOLA

Parámetro de desempeño: Robustez - Día

Laboratorista: _____ Fecha: _____ Hora: _____

DÍA	[] 0	[] 0.2	[] 0.4	[] 0.6	[] 0.8	[] 1
1						
2						
3						
4						
5						

Anexo No. 6. Boleta: Robustez – Día. Donde [] se refiere a la concentración.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA –CEMA-
LABORATORIO DE SANIDAD ACUÍCOLA

Parámetro de desempeño: Robustez – Laboratorista (Lab)

Lab.	[] 0	[] 0.2	[] 0.4	[] 0.6	[] 0.8	[] 1
Lab. X						
Lab. Y						
Lab. Xi						
Lab. Yi						

Anexo No. 7. Boleta: Robustez: laboratorista. Donde [] se refiere a concentración.