

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA**



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

TRABAJO DE GRADUACIÓN:

**“VALIDACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PLOMO, ARSÉNICO Y MERCURIO
EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA”**

**PRESENTADO POR:
MICHELLE GENEVIEVE GUTIÉRREZ ESPINOZA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA**



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

TRABAJO DE GRADUACIÓN:

**“VALIDACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PLOMO, ARSÉNICO Y MERCURIO
EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA”**

**PRESENTADO POR:
MICHELLE GENEVIEVE GUTIÉRREZ ESPINOZA**

**ASESORES:
ING. KAREN ELISA DUBÓN HENRÍQUEZ
DR. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

ING. RUFINO QUEZADA
RECTOR

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ
SECRETARIO GENERAL

DR. RENÉ MADECADEL PERLA JIMÉNEZ
FISCAL GENERAL

Ph. D. RAFAEL ANTONIO GOMEZ ESCOTO
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA

LIC. MARÍA TRINIDAD TRIGUEROS DE CASTRO
SECRETARIA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA

LIC. JOSÉ ALFREDO DÍAZ
DIRECTOR DE ESCUELA DE QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por haberme permitido llegar a culminar una meta mas en mi vida.

A MI FAMILIA: Por apoyar y respetar mis decisiones y alegrarse por mis logros.

A MIS AMIGOS: Por apoyarme y estar pendientes de mi investigación.

A LA ESCUELA DE QUÍMICA: por haber sido el centro de estudios que permitió formar parte importante de mi vida

A MIS ASESORES: Ing. Karen Dubón Henríquez
 Dr. Néstor Orellana Velado

Quienes me brindaron su tiempo, su apoyo y sus consejos para realizar la investigación

AL LABORATORIO GEOQUIMICO DE LAGEO S.A de C.V : Por haberme permitido realizar mi investigacion en sus instalaciones y aportar un poco de mi conocimiento.

Me enorgullezco por este logro y agradezco a todo/as los que me acompañaron en cada día de mi carrera.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
CAPÍTULO 1 “MARCO TEÓRICO”	15
1.1 METALES PESADOS	15
1.1.1 Plomo (Pb).....	17
1.1.2 Mercurio (Hg)	18
1.1.3 Arsénico (As)	21
1.2 VALIDACIÓN ANALÍTICA DE MÉTODOS	23
1.2.1 Confirmación de la identidad.....	23
1.2.2 Límite de detección (LD).....	24
1.2.3 Límite de Cuantificación (LC).....	24
1.2.4 Intervalo de trabajo.....	24
1.2.5 Exactitud.....	25
1.2.6 Precisión.....	26
1.2.7 Sensibilidad	27
1.2.8 Robustez.....	27
1.3 ESPECTROSCOPIA	27
1.3.1 Transformaciones de la energía.....	28
1.3.2 Espectrometría de Absorción.....	28
1.3.3 Absorbancia y Concentración.....	29
1.3.4 Espectrometría Atómica.....	30
1.3.5 Métodos de atomización.....	30
1.4 ESTADÍSTICA APLICADA	31
1.4.1 Comparación de una media experimental con un valor conocido.....	32

CAPITULO 2 “METODOLOGIA EXPERIMENTAL”	34
2.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	34
2.1.1 Digestión de muestras	34
2.2 METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN.....	35
2.3 VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	35
2.3.1 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).....	37
2.3.2 Ámbito de Trabajo.....	37
2.3.3 Sensibilidad	37
2.3.4 Exactitud.....	37
2.3.5 Precisión del Método.....	38
2.4 VALIDACIÓN PARCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y MERCURIO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	39
2.4.1 Límite de Detección (LD)	40
2.4.2 Precisión del Método.....	40
2.4.3 Exactitud.....	41
2.5 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN MUESTRAS REALES.....	41
2.5.1 Normativas para los límites permisibles de metales.	43
 CAPITULO 3 “ANÁLISIS Y RESULTADOS”	 44
3.1 VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	44
3.1.1 Límite de detección y cuantificación.	44
3.1.2 Ámbito de Trabajo.....	45
3.1.3 Exactitud del Método.....	47
3.1.4 Porcentaje de Recobro.	48
3.1.5 Precisión del método.	50

3.2 VALIDACIÓN PARCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN ESPECIES MARINAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA	57
3.2.1 Límite de detección y cuantificación.	57
3.2.2 Linealidad.....	58
3.2.3 Precisión del método.	59
3.2.4 Exactitud del Metodo.....	62
3.3 VALIDACIÓN PARCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN ESPECIES MARINAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA.....	65
3.3.1 Límite de detección y cuantificación.	65
3.3.2 Linealidad.....	66
3.3.3 Precisión del método.	67
3.3.4 Exactitud del Metodo.....	70
3.4 DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN MUESTRAS REALES.	73
3.4.1 Determinación de arsénico, plomo y mercurio por Espectrometría de Absorción Atómica.....	73
CAPITULO 4 “CONCLUSIONES”.....	78
4.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS.	78
4.2 DETERMINACIÓN DE NIVLES DE METALES PESADOS EN MUESTRAS DE PESCADO	79
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	81

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	<i>Densidad de algunos elementos de la tabla periódica clasificados como metales pesados</i>	<i>15</i>
TABLA 2	<i>Límite de detección y cuantificación para la validación de la determinación de plomo por espectrometría de Absorción Atómica</i>	<i>45</i>
TABLA 3	<i>Valores obtenidos en el cálculo del ámbito de trabajo para la curva de calibración en la validación de método para la determinación de plomo....</i>	<i>46</i>
TABLA 4	<i>Repetibilidad del material de referencia certificado DORM-3</i>	<i>47</i>
TABLA 8	<i>Porcentaje de recobro en DORM-3 para plomo</i>	<i>48</i>
TABLA 6	<i>Nivel 1 Fortificación: 0.0500 mg/L de estándar de Plomo</i>	<i>49</i>
TABLA 7	<i>Nivel 2 Fortificación: 0.0700 mg/L de estándar de Plomo</i>	<i>49</i>
TABLA 8	<i>Nivel 3 Fortificación: 0.0900 mg/L de estándar de Plomo</i>	<i>50</i>
TABLA 9	<i>Curvas de calibración para el cálculo de la reproducibilidad</i>	<i>51</i>
TABLA 10	<i>Cálculos del análisis de varianza ANOVA de un factor para la determinación de plomo</i>	<i>52</i>
TABLA 11	<i>Reproducibilidad mediante un estudio R&R entre 2 analistas</i>	<i>53</i>
TABLA 12	<i>Análisis de variables por medida de la Absorbancia</i>	<i>54</i>
TABLA 13	<i>Niveles de absorbancia para un interval de confianza del 95.0 %</i>	<i>55</i>
TABLA 14	<i>Límite de detección y cuantificación para la validación del método para la determinación de arsénico por AA</i>	<i>57</i>
TABLA 15	<i>Valores obtenidos en el cálculo de la linealidad para la elaboración de una curva de calibración en la validación del método para la determinación de arsénico</i>	<i>58</i>
TABLA 16	<i>Repetibilidad de estándar de 0.05 mg/L de solución certificada de arsénico</i>	<i>59</i>
TABLA 17	<i>Repetibilidad del material de referencia certificado DORM-3 “Fish Protein Certified Referente Material for Trace Metals”</i>	<i>60</i>
TABLA 18	<i>Curvas de calibración para el cálculo de la reproducibilidad del método para la determinación de arsénico</i>	<i>61</i>

TABLA 19	<i>Tabla de cálculos del análisis de varianza ANOVA de un factor para la determinación de plomo</i>	<i>62.</i>
TABLA 20	<i>Porcentaje de recobro en material de referencia DORM-3 para arsénico</i>	<i>63</i>
TABLA 21	<i>Nivel 1 Fortificación: 0.0500 mg/L de estándar de arsénico</i>	<i>63</i>
TABLA 22	<i>Nivel 2 Fortificación: 0.0700 mg/L de estándar de arsénico</i>	<i>64</i>
TABLA 23	<i>Nivel 3 Fortificación: 0.0900 mg/L de estándar de arsénico</i>	<i>64</i>
TABLA 24	<i>Límite de detección y cuantificación para la validación del método para la determinación de mercurio por AA</i>	<i>65</i>
TABLA 25	<i>Valores obtenidos en el cálculo de la linealidad para la elaboración de una curva de calibración en la validación del método para la determinación de mercurio</i>	<i>66</i>
TABLA 26	<i>Repetibilidad de estándar de 0.005 mg/L de solución certificada de mercurio.....</i>	<i>67</i>
TABLA 27	<i>Repetibilidad del material de referencia certificado DORM-3 “Fish Protein Certified Referente Material for Trace Metals”</i>	<i>68</i>
TABLA 28	<i>Curvas de calibración para el cálculo de la reproducibilidad</i>	<i>69</i>
TABLA 29	<i>Tabla de cálculos del análisis de varianza ANOVA de un factor para la determinación de mercurio</i>	<i>70</i>
TABLA 30	<i>Porcentaje de recobro en DORM-3 para mercurio</i>	<i>71</i>
TABLA 31	<i>Nivel 1 Fortificación: 0.0010 mg/L de estándar de mercurio</i>	<i>71</i>
TABLA 32	<i>Nivel 2 Fortificación: 0.0050 mg/L de estándar de mercurio</i>	<i>72.</i>
TABLA 33	<i>Nivel 3 Fortificación: 0.010 mg/L de estándar de mercurio.....</i>	<i>72</i>
TABLA 34	<i>Concentraciones, pesos y tamaños del músculo de pescado recolectado en el Puerto de La Libertad para la determinación de metales pesados por espectrometría de absorción atómica</i>	<i>75</i>
TABLA 35	<i>Concentraciones y pesos de vísceras recolectadas en el Puerto de La Libertad para la determinación de metales pesados por espectrometría de absorción atómica</i>	<i>76</i>

ÍNDICE DE GRAFICOS E ILUSTRACIONES

Figura 1	<i>Representación de tipos de absorción de metales pesados en el suelo</i>	16
Figura 2	<i>Plomo Inorgánico</i>	17
Figura 3	<i>Mercurio en la naturaleza</i>	18
Figura 4	<i>Representación del ciclo de absorción del Mercurio en especies vivas</i>	21
Figura 5	<i>Representación gráfica de La ley de Beer-Lambert</i>	29
Figura 6	<i>Proceso de atomización de la muestra dentro de un horno de grafito</i>	30
Figura 7	<i>Ubicación del puerto de la libertad, El Salvador. Zona de muestreo</i>	42
Figura 8	<i>Representación gráfica de una curva de calibración para la determinación de plomo en muestras de peces por absorción atómica. La gráfica muestra la no linealidad del método</i>	51
Figura 9	<i>Representación gráfica de la correlación entre los analistas y las absorbancias obtenidas</i>	54
Figura 10	<i>Representación gráfica de las absorbancias medias para cada nivel</i>	55
Figura 11	<i>Distribución aleatoria de los datos con respecto a la recta</i>	56
Figura 12	<i>Representación gráfica de residuales que muestran una dispersión aleatoria de los datos de absorción</i>	56
Figura 13	<i>Representación gráfica de una curva de calibración para la determinación de arsénico en muestras de peces por absorción atómica demostrando la linealidad del método</i>	61
Figura 14	<i>Representación gráfica de una curva de calibración para la determinación de mercurio en muestras de peces por absorción atómica demostrando la linealidad del método</i>	69

RESUMEN

En el presente trabajo se utilizan tres metodologías para la determinación de metales pesados en especies marinas, siendo los elementos de interés en el estudio, arsénico, plomo y mercurio, por ser metales con un alto grado de toxicidad y mayor deposición en los tejidos de animales. La investigación se centra en la validación de las metodologías utilizando la guía de validación de métodos analíticos Eurachem y la técnica de espectrometría de absorción atómica.

Los parámetros seleccionados en la validación de los métodos son: el límite de detección, límite de cuantificación, ámbito de trabajo, precisión del método, exactitud y porcentaje de recobro. Para el cálculo de la exactitud y precisión se utilizó un material de referencia certificado llamado DORM-3 “*Fish Protein Certified Referente Material for Trace Metals*” de la NCR-CNRC. (*National Research Council of Canada*) 2007.

Como complemento en la investigación se realizó un muestreo de tres especies comerciales en el Puerto de La Libertad con el objeto de determinar la presencia de arsénico, plomo y mercurio en muestras de pescado utilizando las metodologías validadas y así establecer si contienen concentraciones superiores a las establecidas en la norma salvadoreña del Conacyt NSO 67.32.01.08 adopción al reglamento de la Unión Europea 1881/2006/CE y reglamento (CE) 33/2007.

Las pruebas realizadas en las validaciones de las metodologías arrojan resultados aceptables según los lineamientos protocolares y las pruebas estadísticas realizadas a dichos valores; por otro lado los resultados reportados en algunas de las muestras colectadas sobrepasan los límites permisibles establecidos en las normativas.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del medio ambiente es, en general, un proceso inevitable, producto de la modernización de las sociedades humanas que consumen cantidades cada vez más altas de energía y requieren una mayor producción de bienes, con el consecuente incremento de desechos y productos no biodegradables; el mal uso de nuestros recursos naturales, la inadecuada manipulación de desechos químicos e industriales por parte de algunas empresas y la poca protección, por falta de recursos y/o personal especializado de los entes reguladores, han traído como consecuencia un crecimiento en la contaminación marítima con algunas especies química, como los metales pesados, algunos de los cuales son nocivos para la flora, fauna y por lo tanto, a la salud humana.

Estos elementos pesados son especies químicas de origen natural, con pesos atómicos elevados; muchas veces se encuentran en concentraciones bajas en forma de minerales y otras veces alcanzan niveles altos, convirtiéndolos en un contaminante nocivo para los seres vivos. Es necesario recordar, que los seres vivos “necesitan” en pequeñas cantidades de muchos de estos elementos para poder funcionar adecuadamente; pese a esto, no impide que su deposición excesiva pueda generar problemáticas ambientales, tanto en las especies animales como en los seres humanos, de ahí que es responsabilidad de la sociedad en general el disminuir la contaminación a niveles que eviten que los daños a nuestro medio ambiente sean irreversibles.

Las afirmaciones anteriormente expuestas, conducen a la necesidad de efectuar estudios e investigaciones científicas que permitan registrar, tanto los procesos de determinación de los contaminantes, como el nivel de deposición de los mismos, la creación de metodologías adecuadas para el control de contaminantes ha sido regida por diferentes entes acreditados cuyo objetivo es definir parámetros de análisis adecuados para la elaboración de las metodologías, su propósito es el de asegurar que los resultados obtenidos por el estudio sean certeros y confiables.

El regimiento por un ente regulado permitirá establece los protocolos a seguir para validar las metodologías para la determinación de arsénico, plomo y mercurio, éstos metales se encuentran presentes en las muestras de peces las cuales se analizarán utilizando la técnica de absorción atómica por el método de horno de grafito y generador de hidruros.

Los parámetros seleccionados de la guía de los “*Métodos Analíticos adecuados para su propósito/Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados Eurachem*” son los necesarios para una validación completa de las metodologías entre ellos: límite de detección y cuantificación, intervalo de trabajo, exactitud y precisión del método, porcentaje de recobro, entre otros. Dentro de estos criterios se establece la utilización de un material certificado de referencia para la determinación de la exactitud y precisión del método.

Un complemento al estudio consistió en un muestreo aleatorio de tres diferentes especies comerciales de peces en una zona costera del país para aplicar las metodologías validadas a dichas muestras. Para poder establecer si la presencia de algunos elementos tóxicos a la salud humana en las muestras de peces analizadas poseen concentraciones que están sobrepasan los límites permisibles, se toman como referencia la norma salvadoreña del Conacyt, que es una adopción al reglamento de la Unión Europea 1881/2006/CE y reglamento (CE) 33/2007

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ↪ Validar las metodologías para la determinación de arsénico, mercurio y plomo en tejido muscular de pescado por Espectrometría de Absorción Atómica y su aplicación en el análisis de muestras obtenidas en el departamento de la libertad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ↪ Verificar el cumplimiento de las características analíticas del método de determinación de Pb y As en tejido muscular de pescado por Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GTA)
- ↪ Verificar el cumplimiento de las características analíticas del método de determinación de Hg en tejido muscular de pescado por Espectrometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros (VGA)
- ↪ Recolectar diferentes especies de peces en el departamento de la Libertad, con el fin de determinar el grado de contaminación con metales pesados, empleando las metodologías validadas para plomo, mercurio y arsénico.

CAPÍTULO 1 “MARCO TEÓRICO”

1.1 METALES PESADOS

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano. El término "metal pesado" no se encuentra bien definido, a veces se emplea el criterio de densidad, por ejemplo, elementos cuya densidad es igual o superior a 4,5 g/cm³ cuando está en forma elemental, pero algunos valores en la bibliografía parten desde 4 g/cm³ hasta 7 g/cm³, como se observa en la Tabla 1 la cual presenta las densidades de algunos elementos catalogados como metales pesados. Otros criterios empleados son el número atómico y el peso atómico clasificándolos como aquellos cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos. Sin embargo, muchos de los metales que tienen una densidad alta no son especialmente tóxicos y algunos son elementos esenciales en el ser humano. [1]

Tabla 1 Densidad de algunos elementos de la tabla periódica, clasificados como metales pesados.

Elemento	Densidad (g/cm³)
Mercurio (Hg)	13.60
Talio (Tl)	11.85
Plomo (Pb)	11.30
Cadmio(Cd)	8.65
Arsénico (As)	5.7
Aluminio (Al)	2.70

Desde el punto de vista biológico, se distinguen dos grandes grupos de metales pesados; aquellos que no presentan una función biológica conocida y los que tienen la

función de participar como micronutrientes; la presencia de los primeros en los seres vivos lleva a graves disfunciones orgánicas, resultan altamente tóxicos y pueden biomagnificarse.

Los oligoelementos o micronutrientes son requeridos por las plantas, animales y seres humanos en pequeñas cantidades o cantidades traza, ya que son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. El problema es que superado un cierto umbral se vuelven tóxicos. [2]

El contenido de metales pesados en los alimentos tanto de origen vegetal como animal, depende de muchos factores, entre los cuales se encuentran las condiciones medio-ambientales, los métodos de producción, el procesamiento y el lugar de origen del alimento, especialmente en relación a la composición del suelo.

La variación en la composición media entre plantas y mamíferos se atribuye a las diferentes funciones en los mismos; en el caso de tratarse de micronutrientes en los cuales se encuentran elementos sin función biológica conocida, se genera la posibilidad de producir una bioacumulación en la flora y fauna de mayor longevidad.

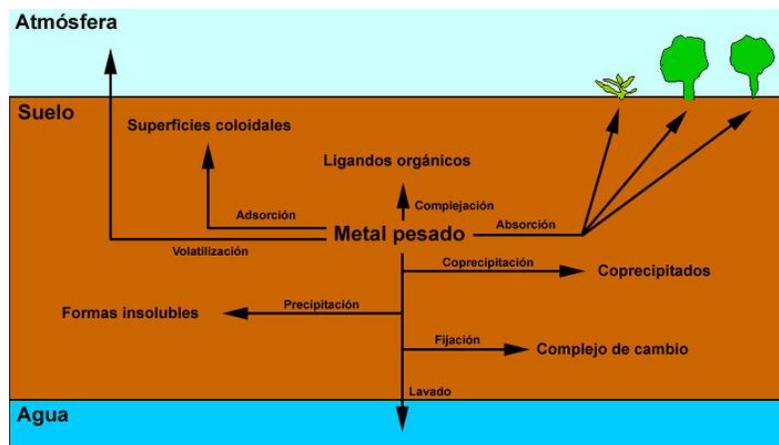


Fig. 1 Representación de tipos de absorción de metales pesados en el suelo. Tomado de <http://www.unex.es/edafo/GCSP/GCSLACEMetalesPesados.html>

La figura 1 muestra el esparcimiento de los metales pesados a través del suelo, su absorción por las plantas, su deposición en los mantos acuíferos subterráneos, así como la formación de otras especies químicas. [3]

Dentro de los elementos pesados más tóxicos y de mayor acumulación en los seres vivos están:

1.1.1 PLOMO (Pb)

El plomo es un metal pesado de densidad relativa de 11.4 a 16°C, de color azulado, que se empaña para adquirir un color gris mate como se muestra en la figura #2. Es flexible, inelástico y se funde con facilidad. Sus compuestos más importantes para la industria son los óxidos de plomo, el tetraetilo de plomo y los silicatos de plomo. Este elemento forma aleaciones con muchos metales y, en general, se emplea de esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones.



Fig. 2 Representación del plomo inorgánico. Tomado de Wikipedia

El uso más amplio se encuentra en la fabricación de acumuladores, sin embargo se encuentra en otras aplicaciones importantes como la fabricación de forros para cables, elementos de construcción, pigmentos, soldadura suave, municiones, plomadas para pesca entre otros.

Efectos en el medio ambiente

El plomo se encuentra de forma natural en el ambiente, pero generalmente, las concentraciones elevadas son el resultado de la contaminación por las actividades humanas. El uso industrial de este metal hace que se acumule en los cuerpos de los seres vivos, por ejemplo en los organismos acuáticos y organismos del suelo. Cada una de estas especies

experimenta efectos en su salud por envenenamiento con plomo, aún cuando solo hay pequeñas concentraciones de él.

Efectos en la salud humana.

El plomo es uno de los metales pesados con mayor efecto perjudicial sobre la salud humana. Este puede ingresar al cuerpo humano a través de la comida (65%), agua (20%) y aire (15%) [2]. Productos alimenticios como frutas, vegetales, carnes, granos, mariscos, refrescos y vino pueden contener cantidades significantes de este elemento, ingresando en la cadena alimenticia y debido a que este metal no cumple ninguna función esencial en el cuerpo humano, puede hacer daño a diferentes órganos como el riñón, hígado, encéfalo y huesos. Dada su similitud con el calcio, el mayor depósito de plomo se localiza en el tejido óseo y puede llegar a ocasionar enfermedades en el ser humano.

1.1.2 MERCURIO (Hg)



*Figura 3 Representación del mercurio en la naturaleza.
Tomado de wikipedia imágenes*

Es un metal pesado plateado como se puede observar en la Figura 3; en ocasiones denominado azogue, se puede presentar de forma natural en el medio ambiente bajo distintas especies químicas. La forma pura, mercurio elemental, es líquida a temperatura ambiente aunque lentamente tiende a evaporarse; produciendo vapores tóxicos y corrosivos, más pesados que el aire. Es dañino por inhalación, ingestión y contacto. Las formas que se encuentran más comúnmente en la naturaleza son el mercurio inorgánico y el mercurio orgánico.

La principal fuente natural de de mercurio es la desgaseificación de la corteza terrestre incluyendo las emisiones volcánicas y la evaporación de los océanos; a éstas hay que

añadirle la extracción minera del mercurio y los productos derivados de sus diferentes aplicaciones en la industria cloroalcalina, en la industria de pinturas o en la fabricación de equipos eléctricos e instrumentos de precisión. También son fuente de contaminación actividades como la utilización de combustibles fósiles, la producción de acero, cemento y la fundición de minerales de sulfuro.

La toxicidad del mercurio depende de la forma química en la que se encuentra. El mercurio elemental apenas es tóxico por vía oral porque se absorbe muy poco y se elimina con mucha rapidez. En cambio, en forma de vapor es absorbido rápidamente por los pulmones pudiendo dar lugar a intoxicaciones tanto agudas como crónicas. Los compuestos inorgánicos del mercurio son más tóxicos que el propio metal pero los efectos biológicos más severos son los de algunos compuestos orgánicos y, de hecho, el metilmercurio está entre los 6 compuestos químicos más peligrosos en el medio ambiente según el *Programa Internacional de Seguridad Química* (IPCS). [4]

El mercurio sufre una bioacumulación a través de la cadena alimentaria acuática, presentándose los niveles más altos en los peces carnívoros de gran tamaño tanto de agua dulce como de agua salada. El metilmercurio constituye aproximadamente un 75% del mercurio total de los pescados de agua marina y cerca de un 90% de los de agua dulce. Por el contrario, el mercurio inorgánico es la forma predominante en moluscos y crustáceos. Muchos países han establecido niveles máximos permitidos de mercurio en pescados que oscilan entre 0.5 y 1 mg/kg según las diferentes legislaciones. [5]

Efectos sobre el medio ambiente

El mercurio es un elemento natural que se encuentra en el medio ambiente. Las actividades humanas, tales como la incineración del carbón y el uso del mercurio en la elaboración de ciertos productos, han incrementado la cantidad de mercurio presente en la atmósfera, los suelos, los lagos, riachuelos y océanos.

Los efectos negativos que pueden tener las diferentes formas de mercurio sobre los seres vivos están muy condicionados por la bioacumulación (acumulación dentro del organismo) y la biomagnificación (acumulación a lo largo de la cadena alimenticia); por ejemplo, los organismos pequeños ingieren el mercurio absorbido en las plantas, algas y desechos que se encuentran en su habitat; y los animales de mayor escala en la cadena alimenticia se alimentan de estos organismos más pequeños, por ende éstos ingieren a su vez el mercurio metálico de manera indirecta. A medida que este proceso, conocido como bioacumulación continúa, los niveles de mercurio aumentan en la cadena alimenticia, hasta llegar al ser humano. *Efectos en la salud humana*

Si bien el mercurio existe en la naturaleza, los niveles ambientales se deben principalmente a las actividades humanas. Aproximadamente, el 80% del mercurio emitido por las actividades humanas es elemental, liberado al aire principalmente por la quema de combustibles fósiles, la minería y las fundiciones y por la incineración de residuos. Cerca del 15% del total se emite al suelo por fertilizantes, fungicidas y residuos sólidos que contienen baterías o termómetros. Un 5% adicional se emite por los efluentes industriales hacia las aguas. [6]

El mercurio puede ingresar al organismo por la piel, por medio de la atmósfera o a través de los alimentos. El metilmercurio es la forma que más fácilmente se absorbe a través del tracto gastrointestinal, por lo que la ingesta de alimentos contaminados lleva al rápido traspaso de mercurio al torrente sanguíneo desde donde se distribuye hacia otras partes del cuerpo, particularmente el cerebro [6], como se representa en la figura 4, la cual muestra el ciclo de absorción del mercurio en los seres vivos.

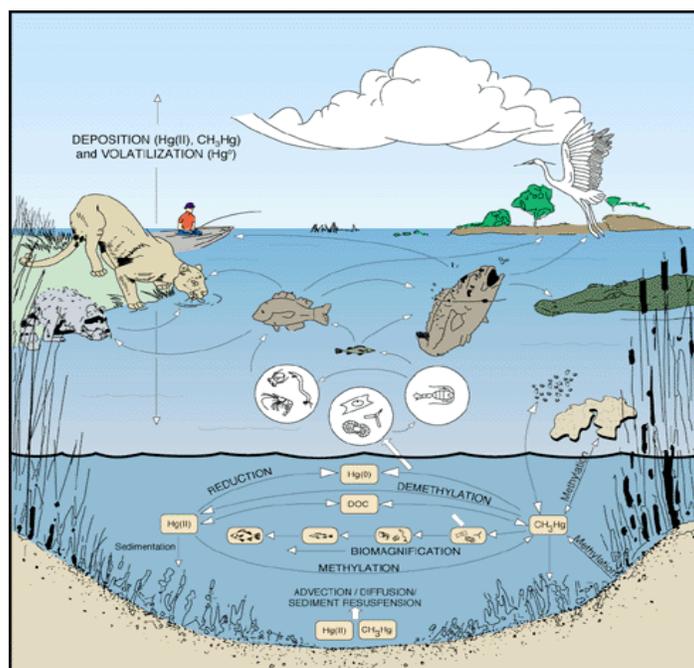


Fig. 4 Representación del ciclo de absorción del Mercurio en especies vivas. Tomado de http://www.ucm.es/info/crismine/Geologia_Minis/Mineria_toxicidad.htm

1.1.3 ARSENICO (As)

Este elemento está ampliamente distribuido en la corteza terrestre en un porcentaje aproximado del 0.0005 %; se encuentra tanto en suelos como en aguas y en la mayoría de los tejidos vegetales y animales. Sin embargo, no se conoce ninguna mina explotable y el metal se obtiene como subproducto en la producción de otros elementos como cobre y plomo.

El arsénico tiene muchas aplicaciones en la industria metalúrgica, especialmente en la obtención de aleaciones, pero su mayor utilidad es en la industria química para la elaboración de medicamentos y plaguicidas, incluyendo conservantes de la madera. La utilización de plaguicidas arsenicales ha sido considerada como la fuente principal de contaminación ambiental en las últimas décadas.

En el estado sólido se ha empleado ampliamente en los materiales láser y como agente acelerador en la manufactura de varios aparatos. El óxido de arsénico se utiliza en la elaboración de vidrio. Los sulfuros se usan como pigmentos y en juegos pirotécnicos. El arseniato de hidrógeno se emplea en medicina, así como otros compuestos de arsénico.

Es un metal extremadamente tóxico a pesar de ser clasificado como un semimetal en la tabla periódica, su densidad es de 5.72 g/cm^3 es persistente en el ambiente y cuya presencia en las zonas contaminadas se mantiene después de muchos años; por su sedentarismo ha sido una de las sustancias que se encuentra actualmente restringida o completamente prohibida.

Efectos en la salud humana.

El arsénico es uno de los elementos más tóxicos que pueden ser encontrados en la naturaleza; los humanos pueden ser expuestos a través de la comida, agua y aire. La exposición puede también ocurrir a través del contacto de la piel con suelo o agua que contenga este elemento.

Los niveles de arsénico en alimento como carnes, frutas y hortalizas pueden ser relativamente bajos; sin embargo, en el músculo de los peces y marisco los niveles pueden incrementarse, ya que su organismo no es capaz de desechar habitualmente lo absorbido, por lo que a medida transcurre el tiempo los elementos tóxicos se acumulan en sus cuerpos y pueden llegar a contaminar al ser humano.

La exposición al arsénico puede ser más alta; para las personas que trabaja con este elemento, para los que beben cantidades altas de vino, para seres humanos que residen en casas que contienen conservantes de la madera y que viven en granjas donde este metal contenido en los pesticidas ha sido aplicado en los campos de cultivo; causándoles efectos sobre la salud, como irritación del estómago e intestinos, disminución en la producción de glóbulos rojos y blancos, cambios en la piel, e irritación de los pulmones.

Efectos en el medio ambiente.

El arsénico puede ser encontrado de forma natural en la tierra en pequeñas concentraciones formando parte de los minerales y puede penetrar en el aire, agua y tierra a través de las tormentas de polvo y las aguas de escorrentía (aguas provenientes del ciclo hidrológico).

Es un componente que es extremadamente difícil de convertir en productos solubles en agua. En el ambiente se encuentran en zonas rodeadas de actividades humanas, mayormente la minería y las fundiciones. [7]

1.2 VALIDACION ANALITICA DE METODOS

Según la ISO (*International Organization for Standardization*), la validación de métodos es *“El proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere aplicación.”*[8]

Un método de análisis debe validarse cuando se necesite verificar que sus parámetros de desempeño se cumplen para una investigación analítica; por ejemplo, cuando se desarrolla un nuevo procedimiento para solucionar un problema específico, cuando se requiere incorporar mejoras, extenderlo o cuando el control de calidad indica que dicho procedimiento establecido está cambiando con el tiempo, entre otras situaciones.

Parámetros para el desempeño de una validación.

1.2.1 Confirmación de la identidad

Los métodos analíticos consisten de una etapa de medición en la cual es necesario establecer que la señal producida atribuida al analito, se debe únicamente a él y no a la presencia química o físicamente de una señal similar. La selectividad y especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.

Según definición se establece que la *selectividad* es la capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de pruebas establecidas. [9] y la *especificidad* es la capacidad de un método para medir solamente lo que se pretende que mida. [10]

1.2.2 Límite de detección (LD)

Al realizar mediciones a niveles bajos de analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante conocer cuál es la concentración más baja del analito, la cual se denomina *Límite de Detección*. La AOAC (*Methods of Analysis of the Association of Official Chemist*) lo establece como “el menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable”; la ISO utiliza como un término general al “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” lo que significa “la concentración neta mínima detectable” y la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) prefiere denominarle “valor (verdadero) mínimo detectable”.

Sabiendo que cada una de estas definiciones es correcta, para propósitos de validación es suficiente proporcionar un indicativo del “*nivel al cual la detección resulta incierta*”.

1.2.3 Límite de Cuantificación (LC)

Estrictamente se puede definir al límite de cuantificación según la IUPAC como “*la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad*”

La NATA (*National Association of Testing Authorities, Australia*) lo define como “*la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba*” [11]

1.2.4 Intervalo de trabajo

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. El intervalo de medición se expresa de manera que el extremo inferior del intervalo de concentración se encuentren los factores limitantes como el límite de detección y/o límite de cuantificación y en el extremo superior del intervalo de concentración se expresen las limitaciones impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

Según la IUPAC se define como “*el conjunto de valores del mesurando para los cuales se pretende que el error de un instrumento de medición caiga dentro de límites específicos*”

1.2.5 Exactitud

La validación de métodos busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios de las medidas. La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero.

Se define como la “*Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado*”; según la IUPAC es “la cantidad referida a las diferencias entre la media de una serie de resultados o un resultado individual y el valor el cual se acepta como valor verdadero o correcto para la cantidad medida”

Normalmente la exactitud se instruye en la veracidad, la cual se define de la siguiente manera:

- La **veracidad** es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado (ISO 3534-1). Se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores de referencia. Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado.

Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables y por lo tanto el valor de referencia es el valor certificado del CRM's (*Material de Referencia Certificado*).

CRM's: material de referencia acompañado de un certificado en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.

Un material de referencia ideal sería un material de referencia certificado de matriz natural, muy semejante a las muestras de interés. La validación requiere la adecuación de un material de referencia que debe ser apropiado para su uso. Por ejemplo, para trabajos normalizados debe usarse un material de referencia certificado adecuado e idealmente de la misma matriz; para métodos utilizados en trabajos internos a largo plazo, deberá utilizarse un material interno estable o un material de referencia certificado y para trabajos a corto plazo o no críticos a menudo es suficiente un patrón preparado por adición.

Para verificar con respecto aún método alternativo, se comparan los resultados de los dos métodos para la misma muestra o muestras. Las muestras pueden ser materiales de referencia certificados, materiales de referencia preparados internamente o simplemente, muestras típicas.

1.2.6 Precisión.

La precisión es la concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas, normalmente se determina para circunstancias específicas, las medidas más comunes son: la repetibilidad y reproducibilidad, estas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse.

La repetibilidad se calcula a partir de “resultados independientes de una prueba que se obtienen con el mismo método sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos”, lo que proporciona una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista,.

1.2.7 Sensibilidad

Cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del mesurando. (VIM (*Vocabulario Internacional de Metrología 1984*) y IUPAC). La sensibilidad es la pendiente de la curva de calibración o curva de respuesta, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito.

1.2.8 Robustez

Medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

En cualquier método habrá ciertas etapas las cuales, si no se llevan a cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione. Cada una de estas etapas debe identificarse como parte del desarrollo del método y si es posible, debe evaluarse por medio de pruebas de robustez. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto sobre la precisión y la exactitud del método.

1.3 ESPECTROSCOPIA

La espectroscopia consiste en la medición e interpretación de fenómenos de absorción, dispersión o emisión de radiación electromagnética que ocurre en átomos, moléculas y otras especies. Esta absorción o emisión se encuentra asociada a los cambios de estados de energía de las especies químicas interactuantes y, puesto que cada especie tiene estados de

energéticos que la caracterizan, esto permite cuantificar y cualificar diferentes tipos de especies.

Sin embargo, en todos los métodos espectrométricos se miden dos variables fundamentales:

1. La longitud de onda (o energía) de la radiación.
2. La cantidad de radiación a dicha longitud de onda.

Un material específico sólo absorbe energía luminosa de ciertas longitudes de onda y puede ser transparente a otras, es decir, las aquellas absorbidas y emitidas dependen de la identidad del compuesto y su magnitud no depende de la masa de analito presente. Sin embargo, la cantidad de luz que se absorbe o se emite sí depende de la cantidad del compuesto presente en la trayectoria luminosa. En fin la espectrometría permite determinar el contenido elemental y molecular de los materiales.

1.3.1 Transformaciones de la energía.

Los resultados de las interacciones de un átomo (o molécula) con sus alrededores y con la luz. La energía penetra y sale del átomo en forma de luz, calor y energía cinética de partículas como lo son electrones. Como la luz puede transformarse en calor, la longitud de onda de la luz emitida puede ser más larga (de menor energía) que la longitud de onda que excita al átomo, y la energía restante se emplea para calentar dicho átomo y sus alrededores.

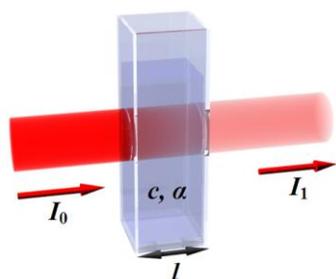
1.3.2 Espectrometría de Absorción.

La Espectroscopia Atómica es un método instrumental que se basa en la absorción de radiación electromagnética por partículas atómicas. Para obtener un espectro de radiaciones de longitudes de ondas específicas, o rangos pequeños en lugar de bandas, es necesario que las partículas de la muestra se descompongan en partículas elementales gaseosas, proceso conocido como atomización.

La espectrometría de absorción consiste en medir la fracción de luz de una determinada longitud de onda que atraviesa por la muestra, como la muestra no emite luz por si misma es necesario incluir una fuente luminosa, usualmente se utiliza una lámpara de cátodo hueco que emite la longitud de onda deseada del elemento de interés. Para realizar un análisis se efectúan dos mediciones; la primera mide la cantidad de luz (a la longitud de onda elegida) que incide sobre la muestra y la segunda es la cantidad de luz que emerge de la misma.

1.3.3 Absorbancia y Concentración.

La absorbancia de una muestra es proporcional a la cantidad total de material que absorbe la luz incidente como lo muestra la ley de Beer en la figura 4 al cual establece que la absorbancia es directamente proporcional a una constante (ϵ) (que es propiedad del material), además de la longitud de onda de la medición; b que es la longitud de la trayectoria que la luz atraviesa por la muestra y C que es la concentración del material que absorbe luz.



$$A = \epsilon b C \quad \text{Ley de Beer-Lambert}$$

Fig. 5 Representación gráfica de La ley de Beer-Lambert. Tomado de Wikipedia

Cuando la **concentración** (C) se expresa en (mol L^{-1}) y la longitud de la trayectoria en cm, la constante (ϵ) **Coefficiente de extinción molar o absortividad molar**, tendrá las unidades ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Es necesario observar que ϵ depende de la longitud de onda de medición, por tanto este valor se escribe como $\epsilon_{\lambda(nm)}$, es decir por ejemplo ϵ_{313} [12].

1.3.4 Espectrometría Atómica.

Tipo de espectrometría capaz de medir la luz emitida por transiciones de átomos o iones y no de especies moleculares; mide los átomos libres en una matriz de fase condensada o de espectros que son esencialmente atómicos. Para la espectrometría de absorción atómica, los átomos del analito no están enlazados químicamente con otros átomos, por lo tanto la matriz de la muestra se destruye completamente, quedando atomizada.

Cuando el elemento que se determina es un gas monoatómico a temperatura cercana a la ambiental, la atomización es bastante sencilla y basta con mantenerlo en un celda cerrada para analizarlo. Sin embargo, si la muestra se introduce como líquido, son necesarios algunos pasos adicionales para el proceso de atomización. Con frecuencia las muestras líquidas se introducen a manera de aspersion al atomizador.

1.3.5 Métodos de atomización.

a) Atomizadores electrotérmicos

En algunas técnicas de absorción atómica se emplean atomizadores electrotérmicos conocido como horno de grafito, que consiste de un tubo cilíndrico de grafito de aproximadamente 1-3 cm de longitud, y 3-8 mm de diámetro. El tubo de grafito es alojado en un ensamble que sella las salidas del tubo con ventanas ópticamente transparentes. El ensamble permite el paso de corrientes de gas inerte, protegiendo el grafito de la oxidación, y removiendo los productos gaseosos producidos durante la atomización. Se utiliza una fuente de poder para pasar la corriente eléctrica a través del tubo de grafito, dando como resultado un calentamiento por la resistencia.

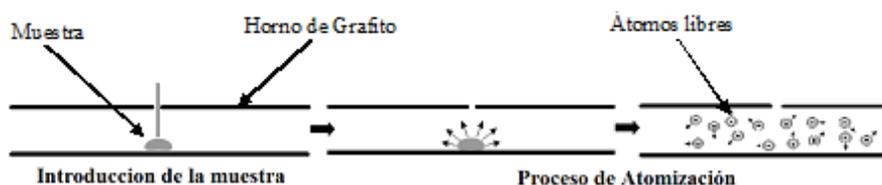


Figura 6. Proceso de atomización de la muestra dentro de un horno de grafito

Las muestras son inyectadas al tubo de grafito a través de un capilar como se muestra en la figura 6. La atomización se logra en tres fases. Primero, la mezcla es secada usando una corriente eléctrica que eleva la temperatura del tubo de grafito a 110°C. En la segunda etapa, que se llama calcinado, la temperatura es incrementada a 350-1200°C, a estas temperaturas cualquier material orgánico es convertido en CO₂ y H₂O, y materiales inorgánicos son volatilizados. Estos gases son removidos por una corriente de gas inerte. En la etapa final, la muestra es atomizada rápidamente incrementando la temperatura a 2000-3000°C. El resultado es un pico precedido cuya altura o área es proporcional a la cantidad de analito inyectado en el tubo. Estas tres etapas se llevan a cabo en 45-90 segundos; la mayor parte del tiempo de análisis es usada para secar y calcinar la muestra.

b) Vaporización química.

Para ciertos elementos que forman hidruros covalentes volátiles, la técnica de formación del hidruro y el análisis subsecuente mejora la eficiencia de atomización, transfiriendo cuantitativamente al analito en la fase vapor como hidruro, para lo cual se utiliza con frecuencia como fuente que aporta mayor intensidad, la lámpara de descarga sin electrodos. El pretratamiento consiste en una unidad generadora de vapor, en la que se produce un hidruro metálico o sus vapores. Estos vapores se inyectan en el atomizador con una corriente gaseosa de inserción. La vaporización química ofrece mejoras en los límites de detección comparada con la atomización por medio de la llama, la generación de hidruros mejora la sensibilidad del método. [13]

1.4 ESTADÍSTICA APLICADA

La estadística aplicada es el área de la estadística que se ocupa de inferir resultados sobre la población a partir de una o varias muestras. Los parámetros poblacionales son estimados mediante funciones denominadas "estimadores" o "estadísticos".

Idealmente una de las propiedades más importantes en un método analítico es la obtención de resultados libres de errores sistemáticos (*aquellos que generan que todos los resultados sean erróneos en el mismo sentido*) y aleatorios (*errores que provocan que los resultados difieran uno de otro de manera que se distribuyan a ambos lados del valor medio*). Esta propiedad se puede medir al aplicar el método a una muestra de ensayo que contenga una cantidad conocida de analito, la cual se contrastara con los resultados obtenidos experimentalmente. [14]

Un contraste de hipótesis o contraste de significación implica, en cualquier investigación, la existencia de dos teorías o hipótesis implícitas, que se denominan hipótesis nula e hipótesis alternativa.

1.4.1 Comparación de una media experimental con un valor conocido.

Un contraste de significación prueba la veracidad de una hipótesis denominada Hipótesis Nula, denotada por H_0 y es aquella mediante la cual un método analítico no está sujeto a errores sistemáticos. El término nulo se emplea para indicar que no hay diferencia entre el valor observado (experimental) y el valor conocido. Suponiendo que esta hipótesis nula es verdadera, a la teoría estadística se puede emplear para calcular la probabilidad de que la diferencia observada entre la media muestral, \bar{X} , y el valor verdadero, μ , se deba solamente a errores aleatorios. Cuanto más pequeña sea la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar, menos probable será que la hipótesis nula sea verdadera. Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada sea por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir 0.05 ó 5%).

Para contrastar H_0 es decir, para decidir si la diferencia entre \bar{X} y μ es significativa, se calcula el estadístico t de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

Donde \bar{X} es la media muestral, s , es la desviación estándar muestral y n , el tamaño muestral.

Si el valor de t calculado es mayor que un cierto valor crítico obtenido de las tablas correspondientes, entonces se rechaza la hipótesis nula. Los grados de libertad utilizados para el estudio t es $n - 1$

CAPITULO 2 “METODOLOGIA EXPERIMENTAL”

La parte experimental se dividió en dos etapas: la validación de las metodologías de análisis para la determinación de metales pesados en especies marinas y su aplicación al análisis de muestras reales recolectadas en el Puerto de La Libertad, a fin de determinar los niveles de contaminación por los metales en estudio.

Instrumental

En el tratamiento de la muestra se utilizó un Digestor de Microonda Marca CEM, modelo MARS 5. Para determinar la presencia y cuantificar los metales pesados presentes en las muestras recolectadas, se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con horno de grafito para plomo y arsénico y generador de hidruros para mercurio, equipo marca Varian, con sus respectivas lámparas.

2.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

2.1.1 Digestión de muestras

Cada una de las muestras utilizadas, tanto para la validación de las metodologías, así como para la determinación de los metales pesados, serán tratadas según una adaptación al método oficial de la AOAC 974.14. [15] como se describe a continuación:

Reactivos

- Ácido nítrico concentrado para análisis de trazas.
- Agua desionizada

Material y Equipo

- Balanza Analítica
- Balones volumétricos de 50 mL

- Probeta de 10 mL
- Vasos de digestión: recipiente de teflón o polietileno cerrado.
- Digestor microonda MARS 5. CEM

Procedimiento

Pesar aproximadamente 0.5 ± 0.15 g de la muestra en un vaso digestor, adicionar 10.0 mL de ácido nítrico concentrado, cerrar el vaso (cuidadosamente ajustar la llave de cierre del vaso digestor), y coloque el recipiente en el carrusel. Se colocó el horno con un programa de temperaturas desde: 35°C a 200°C en 20 minutos, mantener la temperatura final por 10 minutos mas. Enfriar el sistema y dejar reposar a temperatura ambiente. Lleve el carrusel de muestras a la cámara de extracción y desenrosque la llave del recipiente, transfiera la muestra digerida a un balón de 50 mL y afore con agua desionizada.

2.2 METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN.

Para las pruebas de validación se tomaran en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se utilizará un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con sus accesorios necesarios para su funcionamiento.
- Los blancos de muestras será una mezcla de agua desionizada mas ácido nítrico concentrado.
- Cada uno de los materiales a utilizar serán lavados previamente con una mezcla de ácido nítrico concentrado y agua desionizada, a fin de evitar cualquier tipo de contaminación.
- Se utilizara como analito el material de referencia certificado DORM-3 (*Fish protein Certified Referente Material for Trace Metals*).
- Los estándares para la curva de calibración serán preparados diariamente.

2.3 VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACION DE PLOMO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

Materiales

- Portamuestras plásticos para Absorción Atómica.
- Gas Argón Ultra. Alta Pureza.
- Balones volumétricos de 100 mL certificados
- Balones volumétricos de 25 mL y 50 mL
- Micropipeta de 5 mL ajustable
- Micropipeta de 1000 uL ajustable

Reactivos

- Solución Estándar Certificada de Plomo trazable a NIST 1000 mg/L en agua acidificada (nitrato de plomo en ácido nítrico diluido), marca AccuStandard con número de Lote B6075016/JUL2011.
- Material de referencia certificado DORM-3 “Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals” trazable a NRC-CNRC (*National Research Council Canada*, 2007)
- Agua desionizada.

Equipo

- Equipo de Absorción Atómica, marca Varian, modelo 220 Fast Sequential con los componentes: Horno de Grafito (GTA-110), Automuestreador del Horno de Grafito, Lámpara de cátodo hueco de plomo, tubos de grafito y accesorios (específicos para el horno de grafito)
- Digestor CEM, Modelo MARS 5

Parámetros

2.3.1 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

Se realizó lectura de 10 blancos de muestras independientes medidos una vez cada uno. Cada blanco de muestra será preparado midiendo 10 mL de ácido nítrico concentrado para análisis de metales trazas en una probeta, posteriormente se transfirió 10 mL de ácido nítrico concentrado en un balón volumétrico de 50 mL y aforar con agua desionizada. A continuación se tomó una alícuota de la solución y se colocó en un portamuestra para absorción atómica, finalmente se cuantificó la muestra en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Calcular la desviación estándar del valor promedio de los blancos y obtener los valores del LD y LC de la siguiente manera:

$$LD = \text{valor promedio de los blancos de muestra} + 3s$$

$$LC = \text{valor promedio de los blancos de muestra} + 10s$$

2.3.2 Ámbito de Trabajo

Se midió un blanco y estándares de referencia a varias concentraciones (como mínimo 6 concentraciones más el blanco). Graficar la respuesta de la medida contra la concentración del mesurando e identificar los límites inferiores y superiores del ámbito lineal.

2.3.3 Sensibilidad

Se preparó una curva de calibración de 6 concentraciones diferentes, dentro de los límites de trabajo seleccionados. Cada concentración se preparó por triplicado, finalmente se calculó la pendiente de la curva de calibración a fin de evaluar la sensibilidad del método.

2.3.4 Exactitud.

Se analizó 10 veces un material de referencia (DORM-3) utilizando el método a validar. La evaluación de los resultados se realizó comparando el promedio obtenido con el valor

aceptado por el certificado del material de referencia (CMR's DORM-3), con el fin de evaluar si existe diferencia significativa entre los resultados utilizando una comparación de medias muestrales. Para su cálculo se utilizó el estudio t que hace referencia a la siguiente ecuación.

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

a) % Recobro.

Para el porcentaje de recobro se analizó entre 7 y 10 muestras fortificadas y no fortificadas con plomo a tres niveles de concentraciones diferentes (0.0500, 0.0700 y 0.0900 mg/L). El cálculo de recobro se obtuvo para cada concentración de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{M_x \text{ Fortificada} - M_x \text{ No Fortificada}}{\text{Fortificación}} \times 100$$

2.3.5 Precisión del Método

Se realizaron 10 mediciones de una curva de calibración, utilizando como mínimo 5 concentraciones diferentes. Concentraciones: blanco, 0.0250, 0.0500, 0.0750, 0.1000 mg/L

a) Repetibilidad de curvas de calibración

Medición de 10 curvas de calibración en un intervalo de tiempo corto por un mismo analista.

b) Reproducibilidad de curvas de calibración

Se midieron 10 curvas de calibración en un intervalo de tiempo corto por un analista diferente.

En el cálculo de este parámetro permite establecer una hipótesis nula H_0 que comprobara si existe o no diferencia significativa entre los valores obtenidos en la prueba, mediante la comparación de un valor calculado con un valor crítico.

2.4 VALIDACIÓN PARCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y MERCURIO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

Materiales

- Portamuestras plásticos para Absorción Atómica.
- Gas Argón Ultra. Alta Pureza.
- Gas Nitrógeno con pureza de 99.998%.
- Balones volumétricos de 100mL certificados
- Balones volumétricos de 25mLy 50 mL
- Micropipeta de 5mL ajustable
- Micropipeta de 1000 uL ajustable

Reactivos

- Solución Estándar Certificada de Arsénico trazable a NIST 1000 mg/L en agua acidificada, marca Merck, con número de Lote HC625147/301109.
- Solución Estándar Certificada de Mercurio trazable a NIST 1000 mg/L en agua acidificada (nitrato de mercurio en ácido nítrico diluido), Marca Merck. Con número de Lote OC561218.
- Material de referencia certificado DORM-3 “Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals” trazable a NRC-CNRC (National Research Council Canada. 2007
- Agua desionizada.

Equipo

- Equipo de Absorción Atómica, marca Varian, modelo 220 Fast Sequential con los componentes: Horno de Grafito (GTA-110), Automuestreador del Horno de Grafito, Lámpara de cátodo hueco de arsénico, tubos de grafito y accesorios (específicos para el horno de grafito)

- Equipo de Absorción Atómica, marca Varian, Modelo AA240 con los componentes: Generador de Hidruros (VGA-77) y Lámpara de cátodo hueco de Mercurio.
- Digestor CEM, Modelo MARS 5

Parámetros

2.4.1 Límite de Detección (LD)

Se realizó lectura de 10 blancos de muestras independientes medidos una vez cada uno. Cada blanco de muestra será preparado midiendo 10 mL de ácido nítrico concentrado para análisis de metales trazas en una probeta, posteriormente se transfirió 10 mL de ácido nítrico concentrado en un balón volumétrico de 50 mL y aforar con agua desionizada. A continuación se tomo una alícuota de la solución y se cuantificó la muestra en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Calcular la desviación estándar del valor promedio de los blancos y obtener el valor del LD de la siguiente manera:

$$LD = \text{valor promedio de los blancos de muestra} + 3s$$

2.4.2 Precisión del Método

- **Repetibilidad de Estándares.**

Se realizaron entre 7 y 10 mediciones de un estándar de arsénico y mercurio, medido por un mismo analista, equipo y día.

- **Repetibilidad de Muestras.**

Lectura entre 7 y 10 mediciones de un Material de Referencia Certificado (DORM-3), por un mismo analista.

- **Reproducibilidad de la curva de calibración.**

Se realizaron entre 7 y 10 lecturas de un estándar de arsénico y mercurio a 5 niveles de concentración.

Concentraciones para la curva del arsénico: blanco, 0.0250, 0.0500, 0.0750, 0.1000 mg/L

Concentraciones para la curva del mercurio: blanco, 0.0010, 0.0050, 0.010 y 0.0200 mg/L

2.4.3 Exactitud.

Se analizó 10 veces un material de referencia (DORM-3) utilizando el método a validar. La evaluación de los resultados se realizó comparando el promedio obtenido con el valor aceptado por el certificado del material de referencia (CMR´s DORM-3), con el fin de evaluar si existe diferencia significativa entre los resultados utilizando una comparación de medias muestrales. Para su cálculo se utilizó el estudio t que hace referencia a la siguiente ecuación.

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

a) % Recobro.

Para el porcentaje de recobro se analizó entre 7 y 10 muestras fortificadas y no fortificadas con plomo a tres niveles de concentraciones diferentes (0.0500, 0.0700 y 0.0900 mg/L). El cálculo de recobro se obtuvo para cada concentración de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{M_x \text{ Fortificada} - M_x \text{ No Fortificada}}{\text{Fortificación}} \times 100$$

2.5 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN MUESTRAS REALES.

A fin de completar el estudio, las metodologías validadas serán aplicadas a muestras reales, recolectadas en una zona propensa a la contaminación en el interior del país. La zona de muestreo se realizó en la zona costera del departamento de La Libertad como se

muestra en la figura 7, dicha zona posee un alto comercio en productos de pesca y se considera un lugar apropiado para evaluar los niveles de contaminación que presenta.

Del muestreo se recolectó entre 5 y 7 muestras, se lavaron con agua desionizada y fueron guardadas en bolsas plásticas selladas de polietileno y colocadas en un recipiente térmico a una temperatura apropiada para la conservación de las muestras. Posteriormente se transportó al laboratorio para realizar el análisis deseado.

El tipo de especímenes a recolectar fueron:

Nombre común: *Curvina*

Nombre científico: *Pachyurus Bonariensis Specium*

Nombre Común: *Bagre*

Nombre Científico: *Arius, Cathorops Specium*

Nombre Común: *Pargo*

Nombre Científico: *Lutjanus Specium*



Fig. 7 Ubicación del puerto de la libertad, El Salvador. Zona de muestreo.
Tomado de Google Earth

Posteriormente, cada muestra será clasificada por especie, tamaño, peso y zona de muestreo. Los pescados serán lavados con agua desionizada y seccionados con utensilios plásticos a fin de evitar cualquier contaminación. Las partes del pescado se clasificarán en:

- a) Músculo de pescado
- b) Vísceras: intestinos, hígado, estómago, entre otros
- c) Residuos: escamas, vertebras, espinas, cabeza.

Las porciones que serán de interés en el estudio son: las vísceras y el musculo del pescado, ya que según literatura consultada los niveles de deposición son mayores en estas partes del pescado. Posterior a la clasificación, cada muestra será llevada al laboratorio Geoquímico de LaGeo S.A de C.V, donde se aplicara el tratamiento de las muestras utilizadas en los protocolos de validación descritos en la sección 2.1.1

2.5.1 Normativas para los límites permisibles de metales.

Según base de datos y estudios realizados, la normativas que se adaptan para la comparación de este estudio es la Normativa Salvadoreña del CONACYT NSO 67.32.01:08 adopción al Reglamento de la Unión Europea 1881 / 2006 / CE y Reglamento (CE) 333 / 2007) que estipula un contenido máximo de 1.0 mg/kg peso de plomo en la ingesta, para el mercurio la normativa lo restringe a 0.3 mg/kg peso.

En el caso del arsénico la norma salvadoreña del Conacyt al igual que el reciente Reglamento de la Comisión Europea no tiene vigente una normativa para este tipo de contaminante. Actualmente sólo Australia y Nueva Zelanda limitan a 1.5 mg/kg peso los contenidos de arsénico inorgánico en productos de la pesca.

Otra organización como la FAO/OMS establece los siguientes valores de referencia [Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP)] para la ingesta de Pb, Hg y As inorgánico a través de los alimentos: 25 µg Pb/Kg de peso corporal/semana; 7 µg Hg/Kg de peso corporal/semana y 15 µg As inorgánico/Kg de peso corporal/semana. [16]

CAPITULO 3 “ANÁLISIS Y RESULTADOS”

3.1 VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACION DE PLOMO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

3.1.1 Límite de detección y cuantificación.

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante conocer la concentración más baja del analito que puede detectarse y cuantificarse confiablemente por el método a utilizar.

Para la estimación del límite de detección y de cuantificación se prepararon 10 blancos independientes y se procedió a su lectura como se muestra en la tabla #2, los resultados son calculados tomando como base la “*IUPAC Compendium of Chemical Technology 1985/ Eurachem 2005*”, donde se establece en este parámetro a X_L o LD como la concentración que se deriva de la medida más pequeña que puede detectarse con certeza razonable por un procedimiento analítico dado. El valor de X_L es dado por:

$$X_L = X_{BL} + 3S_o$$

Para el límite de cuantificación se cita la convención utilizada por la “*IUPAC Orange Book*” el cual define a este como las características de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición química para “cuantificar” adecuadamente un analito. Para la representación de este parámetro se toma como base la ecuación:

$$LC = 10 S_o$$

Tabla 2 Limite de detección y cuantificación para la validación del método para la determinación de plomo por AA

MUESTRA	CONCENTRACIÓN [mg/L]
Blanco 1	0,0013
Blanco 2	0,0002
Blanco 3	0,0002
Blanco 4	0,0012
Blanco 5	0,0004
Blanco 6	0,0000
Blanco 7	0,0006
Blanco 8	0,0003
Blanco 9	0,0008
Blanco 10	0,0013
PROMEDIO	0.0006
MIN	0,0000
MAX	0,0013
DESV. STD. (So)	0,0005
LDD	0,0021
LDC	0,0050

Los valores reportados en las medidas de las repeticiones de los blancos, muestran que la concentración mínima detectable para la determinación de plomo en matrices de peces es de 0.0021 mg/L y el valor mínimo cuantificable para la misma matriz es de 0.0050 mg/L

3.1.2 *Ámbito de Trabajo*

En cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito sobre los cuales el método puede aplicarse. Por lo general, se establece en el extremo inferior del intervalo de concentraciones al límite de detección y/o cuantificación, en el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán interpuestas por los efectos que dependan del sistema de respuesta del instrumento.

En la práctica se procede a realizar lecturas de 5 concentraciones del material estándar de referencia. Se hicieron tres lecturas de cada concentración preparadas de forma independiente y no de alícuotas de la misma solución madre como se muestra en la tabla 3. Se calcula el coeficiente de variación de la respuesta del método: respuesta/concentración.

Se efectúa las repeticiones siguiendo el procedimiento descrito para el Método de determinación de Plomo por Absorción Atómica- Horno de Grafito en muestras de origen marino.

Tabla 3 Valores obtenidos en el cálculo del ámbito de trabajo para la elaboración de una curva de calibración en la validación de método para la determinación de plomo.

Concentración Teórica del estándar [mg/L]	Resultado Practico [mg/L]	Absorbancia	Promedio de Absorbancia	Desviación Estándar Promedio	%CV
0.010	0.009	0.0904			
0.010	0.009	0.0901	0.088	0.0048	5.45
0.010	0.008	0.082			
0.025	0.021	0.2108			
0.025	0.021	0.2077	0.208	0.0025	1.19
0.025	0.021	0.2059			
0.050	0.044	0.4051			
0.050	0.041	0.3875	0.397	0.0088	2.23
0.050	0.043	0.3976			
0.075	0.065	0.5475			
0.075	0.064	0.5439	0.549	0.0056	1.01
0.075	0.066	0.5548			
0.100	0.093	0.6823			
0.100	0.092	0.677	0.681	0.0031	0.46
0.100	0.093	0.6825			

Para el intervalo lineal de trabajo de un método analítico se establece como desviación estándar o RSD valores menores de un 5%, sin embargo los resultados reportados por la metodología para la determinación de plomo en matrices de peces, establece un RSD máximo del 6% debido a su comportamiento no lineal del método lo que permite extender un 1% de error en la medida del intervalo de trabajo.

3.1.3 Exactitud del Método

La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) del valor real.

En la determinación de la exactitud del método, se evaluara la repetibilidad de un material de referencia certificado. (DORM-3)

Valor según certificado	Limite inferior	0.345 mg/kg
0.395 +/- 0.050 mg/kg	Limite Superior	0.445 mg/kg

Tabla 4 Repetibilidad del material de referencia certificado DORM-3
“Fish Protein Certified Referente Material for Trace Metals”

Replica	Absorbancia	Resultado Práctico (mg/kg)
1	0.0174	0.3967
2	0.0156	0.3691
3	0.0168	0.3977
4	0.0159	0.3761
5	0.0160	0.3998
6	0.0176	0.3905
7	0.0171	0.3686
8	0.0177	0.3994
9	0.0168	0.3976
10	0.0170	0.3992
PROMEDIO	0.0168	0.3895
MIN	0.0156	0.3686
MAX	0.0177	0.3998
DESV. STD. (So)	0.0007	0.0130
RSD %	4.3627	3.3334

Los valores reportados en la tabla 4 muestra las medidas repetidas de un Material de Referencia Certificado con una desviación estándar de 0.0130 y un RSD del 3.333 %, valores aceptables según las convecciones establecidas por la “*Guía de Laboratorio para la validación de métodos analíticos EURACHEM*”. Asimismo se puede observar que el promedio (0.3895 mg/kg) de las medidas repetidas se encuentra dentro del rango de error del valor reportado por el certificado de referencia DORM-3 (0.395 +/- 0.050 mg/kg).

3.1.4 Porcentaje de Recobro.

En el porcentaje de recobro se procedió a realizar la determinación de plomo en 9 muestras independiente del material de referencia DORM-3. Posteriormente se realizó la fortificación de la matriz a tres niveles de concentración dentro del rango de la curva de calibración como lo muestran las tablas 5, 6, 7 y 8.

Tabla 5 Porcentaje de recobro en DORM-3 para plomo.

Replicas	Concentración plomo según certificado de Referencia. Valor Teórico [mg/L]	Concentración plomo. Valor Práctico[mg/L]	% Recobro
1	0.3950	0.3967	100.4
2	0.3950	0.3691	93.4
3	0.3950	0.3977	100.7
4	0.3950	0.3761	95.2
5	0.3950	0.3998	101.2
6	0.3950	0.3905	98.9
7	0.3950	0.3686	93.3
8	0.3950	0.3994	101.1
9	0.3950	0.3976	100.7
PROMEDIO			98.3

Tabla 6 Nivel 1 Fortificación: 0.0500 mg/L de estándar de Plomo.

Replicas	Concentración plomo en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración plomo en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.004	0.055	102.0
2	0.001	0.054	106.0
3	0.002	0.057	110.0
4	0.002	0.055	106.0
5	0.003	0.056	106.0
6	0.009	0.058	98.0
7	0.004	0.057	106.0
8	0.010	0.058	96.0
9	0.002	0.059	114.0
PROMEDIO			104.9

Tabla 7 Nivel 2 Fortificación: 0.0700 mg/L de estándar de Plomo.

Replicas	Concentración plomo en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración plomo en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.004	0.076	102.9
2	0.001	0.078	110.0
3	0.002	0.077	107.1
4	0.002	0.078	108.6
5	0.003	0.079	108.6
6	0.009	0.077	97.1
7	0.004	0.076	102.9
8	0.010	0.078	97.1
9	0.002	0.078	108.6
PROMEDIO			104.8

Tabla 8 Nivel 3 Fortificación: 0.0900 mg/L de estándar de Plomo.

Replicas	Concentración plomo en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración plomo en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.004	0.096	102.2
2	0.001	0.096	105.6
3	0.002	0.082	88.9
4	0.002	0.099	107.8
5	0.003	0.099	106.7
6	0.009	0.095	95.6
7	0.004	0.094	100.0
8	0.010	0.081	78.9
9	0.002	0.095	103.3
PROMEDIO			98.8

Los valores obtenidos en los diferentes niveles de concentración en muestras de peces fueron: para el nivel 1 de concentración 0.0500 mg/L con 104.9 %; el nivel 2 de concentración 0.0700 mg/L con 104.8% y el nivel 3 de concentración 0.0900 mg/L con 98.8%

Los resultados reportados en la recuperación del analito (plomo), muestran un porcentaje aceptable y que cae dentro del rango establecido en la guía de validación de métodos Eurachem, donde define a un porcentaje (%) de recuperación aceptable del 80-120%

3.1.5 Precisión del método.

a) Reproducibilidad de las curvas de calibración.

Se estimó la precisión del método mediante la reproducibilidad de las curvas de calibración, para lo cual se procedió a la lectura de 8 preparaciones independientes de un

material de referencia a 5 niveles de concentración. Las preparaciones y lecturas las efectuó el analista titular, utilizando la misma solución patrón de plomo, equipo y en días diferentes.

De las 8 curvas de calibración se calculo el promedio, la desviación estándar y el RSD de las absorbancias generadas por cada nivel de concentración.

Los resultados se tabulan a continuación:

Tabla 9 Curvas de calibración para el cálculo de la reproducibilidad.

Solución Estándar [mg L ⁻¹]	Curva 1 (Abs)	Curva 2 (Abs)	Curva 3 (Abs)	Curva 4 (Abs)	Curva 5 (Abs)	Curva 6 (Abs)	Curva 7 (Abs)	Curva 8 (Abs)	Promedio	Desviación Estándar	RSD %
0.000	0.0056	0.0020	0.0024	0.0028	0.0022	0.0021	0.0033	0.0013	0.003	0.0013	-
0.025	0.2467	0.2443	0.2390	0.2425	0.2349	0.2368	0.2299	0.2329	0.238	0.0058	2.45
0.050	0.4461	0.4414	0.4476	0.4252	0.4188	0.4370	0.4207	0.4211	0.432	0.0121	2.80
0.075	0.6108	0.5865	0.5747	0.5804	0.5801	0.5726	0.5726	0.5741	0.581	0.0128	2.20
0.100	0.7021	0.6985	0.7073	0.6881	0.6837	0.6913	0.6883	0.6919	0.694	0.0080	1.15

A continuación se muestran una de las curvas de calibración obtenidas en la experiencia:

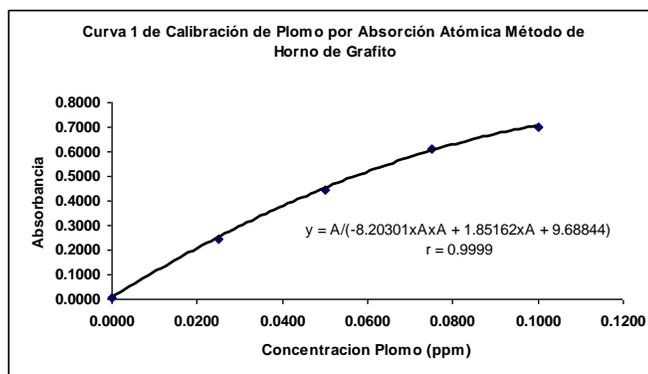


Fig. 8 Representación gráfica de una curva de calibración para la determinación de plomo en muestras de peces por absorción atómica. La gráfica muestra la no linealidad del método.

Para determinar el grado de reproducibilidad que poseen los datos obtenidos se realiza un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para el grupo de datos de las 8 curvas de calibración a 5 niveles de concentración como se muestra en la siguiente tabla de resultados.

Tabla 10 Tabla de cálculos del análisis de varianza ANOVA de un factor para la determinación de plomo.

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	5	2.0113	0.40226	0.0792132
Columna 2	5	1.9727	0.39454	0.0770240
Columna 3	5	1.971	0.3942	0.0777644
Columna 4	5	1.939	0.3878	0.0745027
Columna 5	5	1.9197	0.38394	0.0743721
Columna 6	5	1.9398	0.38796	0.0750623
Columna 7	5	1.9148	0.38296	0.0745473
Columna 8	5	1.9213	0.38426	0.0754017

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F_{tab}</i>
Entre grupos	0.001581	7	0.000226	0.002973	0.99999999	2.312741
Dentro de los grupos	2.431551	32	0.075986			
Total	2.433132	39				

Se obtiene que el F calculado para la serie de datos (a un nivel de confianza del 99.9%) y el F crítico de tablas no muestra que haya diferencia significativa entre medias de la serie de datos.

b) Reproducibilidad del método.

Se evaluó la precisión del método mediante un estudio R&R entre 2 analistas en el desarrollo del análisis como se muestra en la tabla 11. Se hicieron 7 curvas de calibración por cada analista. Las preparaciones y lecturas las efectuó cada analista, utilizando la misma solución patrón de plomo, equipo y en días diferentes.

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 11 Reproducibilidad mediante un estudio R&R entre 2 analistas.

DIA 1 29/01/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0040	0,1960	0,3698	0,5071	0,6424	0,0029	0,2038	0,3759	0,5278	0,6333
R	0,9999					1,000				
DIA 2 30/01/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0053	0,1608	0,3175	0,4682	0,5807	0,0033	0,1530	0,2955	0,4565	0,5919
R	1,000					0,9999				
DIA 3 31/01/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0038	0,1639	0,3255	0,4776	0,5996	0,0038	0,1905	0,3537	0,5229	0,6455
R	1,000					0,9999				
DIA 4 01/02/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0049	0,2664	0,4345	0,5916	0,6872	0,0084	0,2624	0,4512	0,5795	0,6867
R	0,9994					0,9998				
DIA 5 04/02/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0046	0,2429	0,4241	0,5471	0,6848	0,0065	0,2485	0,4021	0,5390	0,6393
R	0,9995					0,9993				
DIA 6 05/02/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0039	0,2452	0,4484	0,5782	0,6799	0,0051	0,2539	0,4378	0,5854	0,6848
R	1,0000					0,9998				
DIA 7 06/02/08										
Analista	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
mg L⁻¹	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbancia	0,0078	0,2093	0,3684	0,5194	0,6212	0,0031	0,1727	0,3799	0,5090	0,6781
R	1,0000					0,9994				

A la vez se presentan los resultados del estudio R&R realizado en el programa Statgraphic, donde se evalúa la influencia los factores de: analista, día y nivel de concentración en el análisis de plomo.

El análisis multifactor ANOVA construye varios tests y graficas para determinar que factores tienen un efecto significativo estadísticamente en la absorbancia. La tabla 12 muestra que el analista no influye en el proceso de medición (ABS), ya que el valor de P-value (0.5812) es mayor a 0.05, con un nivel de confianza del 95.0%.

**Multifactor ANOVA - Abs
Analysis Summary**

Dependent variable: Abs

Factors:

- Analista
- Día
- Nivel

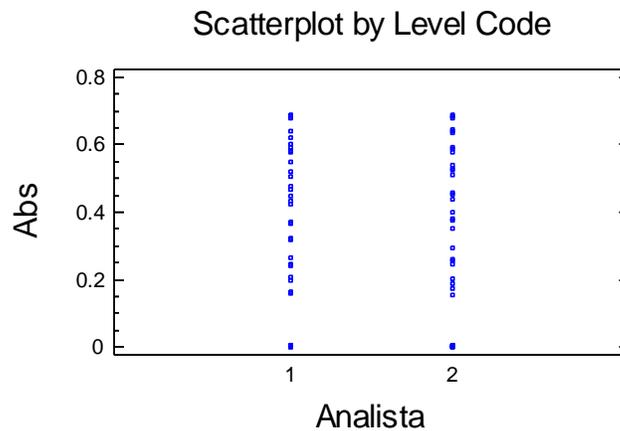


Fig. 9 Representación gráfica de la correlación entre los analistas y las absorbancias obtenidas.

Tabla 12 Análisis de variables por medida de la Absorbancia

Origende las variables	Suma de los cuartiles	Df	Promedio Quartiles	F-Ratio	P- Value
<i>Variables</i>					
A: analista	0.000147756	1	0.000147756	0.31	0.5812
B: Día	0.0704111	6	0.0117352	24.44	
C. Nivel	3.63217	4	0.908042	1890.86	
Residual	0.0278532	58	0.000480227		
Total	3.73058	69			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

El siguiente gráfico y tabla muestra las absorbancias medias para cada nivel de los factores evaluados. También muestra el error estándar de cada media a un nivel de confianza del 95.0%.

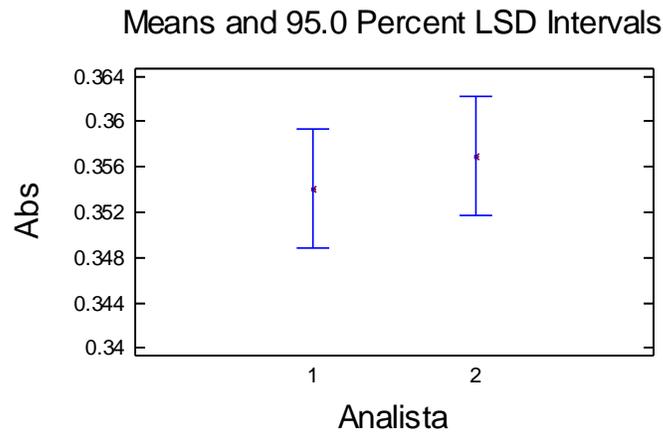


Fig. 10 Representación gráfica de las absorbancias medias para cada nivel.

Tabla 13 Niveles de absorbancia para un interval de confianza del 95.0%

Nivel	Cuentas	Promedio Estandar	Mínimo Error	Máximo Límite	Límite
Analista		70	0.35551		
1	35	0.354057	0.00370416	0.346642	0.361472
2	35	0.356963	0.00370416	0.349548	0.364378
Día					
1	10	0.3463	0.00692984	0.332428	0.360172
2	10	0.30327	0.00692984	0.289398	0.317142
3	10	0.32868	0.00692984	0.314808	0.342552
4	10	0.39728	0.00692984	0.383408	0.411152
5	10	0.37389	0.00692984	0.360018	0.387762
6	10	0.39226	0.00692984	0.378388	0.406132
7	10	0.34689	0.00692984	0.333018	0.360762
Nivel					
1	14	0.00481429	0.00585678	-0.00690937	0.0165379
2	14	0.212093	0.00585678	0.200369	0.223817
3	14	0.384593	0.00585678	0.372869	0.396317
4	14	0.529236	0.00585678	0.517512	0.540959
5	14	0.646814	0.00585678	0.635091	0.658538

La tabla 13 muestra que no hay diferencia significativa entre el analista 1 y el analista 2 en el proceso de medición (ABS), ya que el valor de media para el analista 1 es de 0.354057 mientras que para el analista 2 es de 0.356963.

A continuación se presentan los gráficos de distribución normal de los datos de absorbancia, así como la grafica de residuales.

El primer grafico muestra que existe una distribución aleatoria de los datos de absorbancia respecto a la recta trazada. El segundo grafico de residuales muestra una dispersión aleatoria de los datos de absorbancia.

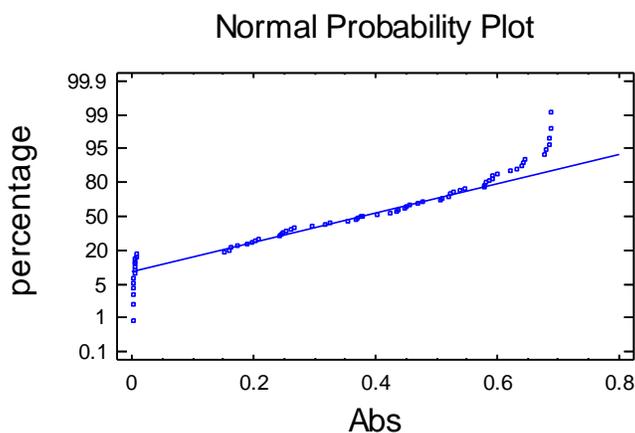


Fig. 11 Distribución aleatoria de los datos con respecto a la recta.

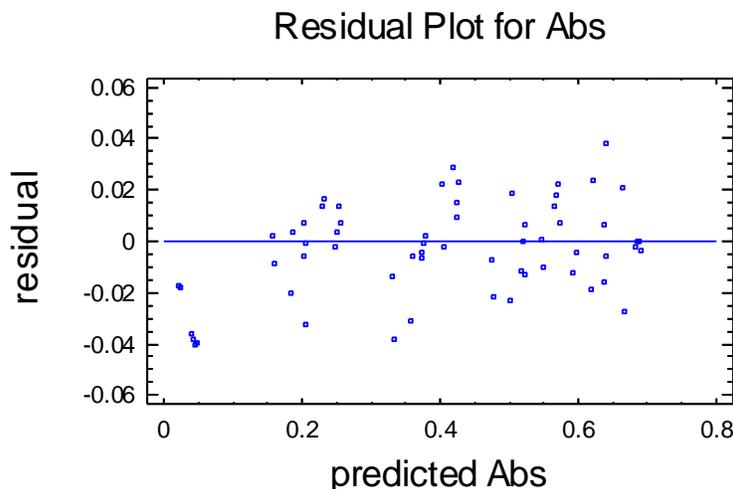


Fig. 12 Representación gráfica de residuales que muestran una dispersión aleatoria de los datos de absorción.

3.2 VALIDACIÓN PARCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

3.2.1 Límite de detección y cuantificación.

Se prepararon 10 blancos independientes y se procedió a su lectura. El límite de detección y cuantificación se calculo en base a la desviación estándar de los resultados (So), donde: LDD=3So y LDC= valor blanco+10So

Tabla 14 Límite de detección y cuantificación para la validación del método para la determinación de arsénico por AA

Identificación	Resultado Practico [mg/L]
Blanco 1	0.0091
Blanco 2	0.0063
Blanco 3	0.0124
Blanco 4	0.0068
Blanco 5	0.0074
Blanco 6	0.0065
Blanco 7	0.0081
Blanco 8	0.0066
Blanco 9	0.0079
Blanco 10	0.0080
PROMEDIO	0.0079
MIN	0.0063
MAX	0.0124
DESV. STD. (So)	0.0018
LDD	0.0054
LDC	0.0260

Los valores reportados en las medidas de las repeticiones de los blancos, muestran que la concentración mínima detectable para la determinación de arsénico en matrices de peces es de 0.0054 mg/L y el valor mínimo cuantificable para la misma matriz es de 0.0260 mg/L. Lo cual se encuentra aceptable por comparación con los valores de concentraciones que se espera obtener en la validación del método.

3.2.2 Linealidad

A fin de evaluar la relación entre la señal analítica (y) y la concentración (x) se procede a realizar lecturas de 6 concentraciones del material estándar de referencia. Se hicieron tres lecturas de cada concentración preparadas de forma independiente y no de alícuotas de la misma solución madre. Se calculo el coeficiente de variación de la respuesta del método: respuesta/concentración.

El analista efectuó las repeticiones como muestra la tabla 15 siguiendo el procedimiento descrito para el Método para la determinación de Arsénico por Absorción Atómica- Horno de Grafito en muestras de origen marino.

Tabla 15 Valores obtenidos en el cálculo de la linealidad para la elaboración de una curva de calibración en la validación del método para la determinación de arsénico.

Concentración Teórica de la solución estándar [mg/L]	Resultado Practico [mg/L]	Absorbancia (Abs)	Promedio de Absorbancia	Desviación Estándar Promedio	%CV
0.010	0.0128	0.0125			
0.010	0.0128	0.0125	0.012	0.0003	2.82
0.010	0.0116	0.0119			
0.050	0.0486	0.0540			
0.050	0.0493	0.0524	0.053	0.0008	1.52
0.050	0.0493	0.0530			
0.100	0.0910	0.0864			
0.100	0.0944	0.0897	0.089	0.0024	2.71
0.100	0.0959	0.0911			
0.200	0.1850	0.0878			
0.200	0.1856	0.0881	0.088	0.0007	0.84
0.200	0.1827	0.0867			
0.400	0.4570	0.0455			
0.400	0.4595	0.0457	0.045	0.0006	1.29
0.400	0.4331	0.0446			
0.500	0.5133	0.0529			
0.500	0.5326	0.0548	0.053	0.0018	3.31
0.500	0.4984	0.0513			

Los porcentajes del coeficiente de variación obtenidos se encuentran dentro del rango que se estipula como aceptable en la literatura estadística menor al 5%.

3.2.3 Precisión del método.

a) Repetibilidad de Estándares

El estándar que se utilizó para la verificar la repetibilidad del método fue un estándar de 0.05 ppm preparado a partir de Solución Estándar Certificada de Arsénico trazable a NIST 1000 mg/L en agua acidificada, Marca Merck. Los datos reportados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16 Repetibilidad de estándar de 0.05 mg/L de solución certificada de arsénico

Replica	Absorbancia	Resultado Práctico (mg/L)
1	0.3844	0.0495
2	0.3855	0.0491
3	0.3806	0.0504
4	0.3865	0.0506
5	0.3912	0.0514
6	0.3721	0.0526
7	0.3780	0.0505
8	0.3770	0.0489
9	0.3799	0.0481
PROMEDIO	0.3817	0.0501
MIN	0.3721	0.0481
MAX	0.3912	0.0526
DESV. STD. (So)	0.0058	0.0014
RSD %	1.5147	2.7533

b) Repetibilidad de muestras (Material Certificado de Referencia DORM-3)

Valor según certificado	Limite inferior	6.58 mg/kg
6.88 +/- 0.30 mg/kg	Limite Superior	7.18 mg/kg

Tabla 17 Repetibilidad del material de referencia certificado DORM-3
 “Fish Protein Certified Referente Material for Trace Metals”

Replica	Absorbancia	Resultado Practico [mg/L]	Resultado Práctico [mg/kg]
1	0.0170	0.0760	7.1997
2	0.0169	0.0759	7.2355
3	0.0167	0.0796	7.0046
4	0.0159	0.0796	6.9923
5	0.0160	0.0785	7.0912
6	0.0176	0.0717	6.9992
7	0.0171	0.0762	7.1860
8	0.0177	0.0766	7.0860
9	0.0168	0.0705	7.0080
PROMEDIO	0.0169	0.0761	7.0892
MIN	0.0159	0.0705	6.9923
MAX	0.0177	0.0796	7.2355
DESV. STD. (So)	0.0006	0.0032	0.0963
RSD %	3.6465	4.1904	1.3588

De los resultados tabulados en la tabla 17 se observan que los valores de desviación estándar y RSD para la serie de datos es menor del 5%, por lo tanto se acepta que el método es preciso.

c) Reproducibilidad de las curvas de calibración.

Se estimo la precisión del método mediante la reproducibilidad de las curvas de calibración, para lo cual se procedió a la lectura de 7 preparaciones independientes de un material de un estándar de referencia a 5 niveles de concentración. Las preparaciones y lecturas las efectúo uno de los analistas, utilizando la misma solución patrón de arsénico, equipo y en días diferentes. De las 7 curvas de calibración se calculo el promedio, la desviación estándar y el RSD de las absorbancias generadas por cada nivel de concentración.

Los resultados se tabulan a continuación:

Tabla 18 Curvas de calibración para el cálculo de la reproducibilidad del método para la determinación de arsénico

Solución Estándar [mg/L]	Curva 1 (Abs)	Curva 2 (Abs)	Curva 3 (Abs)	Curva 4 (Abs)	Curva 5 (Abs)	Curva 6 (Abs)	Curva 7 (Abs)	Promedio	Desviación Estándar	RSD %
0.000	0.0091	0.0063	0.0124	0.0068	0.0074	0.0065	0.0081	0.0081	0.0021	-
0.025	0.0335	0.0292	0.0302	0.0305	0.0299	0.0299	0.0304	0.0305	0.0014	4.54
0.050	0.0573	0.0529	0.0550	0.0607	0.0561	0.0550	0.0581	0.0564	0.0025	4.48
0.075	0.0820	0.0807	0.0814	0.0809	0.0858	0.0840	0.0864	0.0830	0.0024	2.85
0.100	0.1156	0.1103	0.1113	0.1033	0.1176	0.1060	0.1122	0.1109	0.0050	4.52

A continuación se muestran una de las curvas de calibración obtenidas:

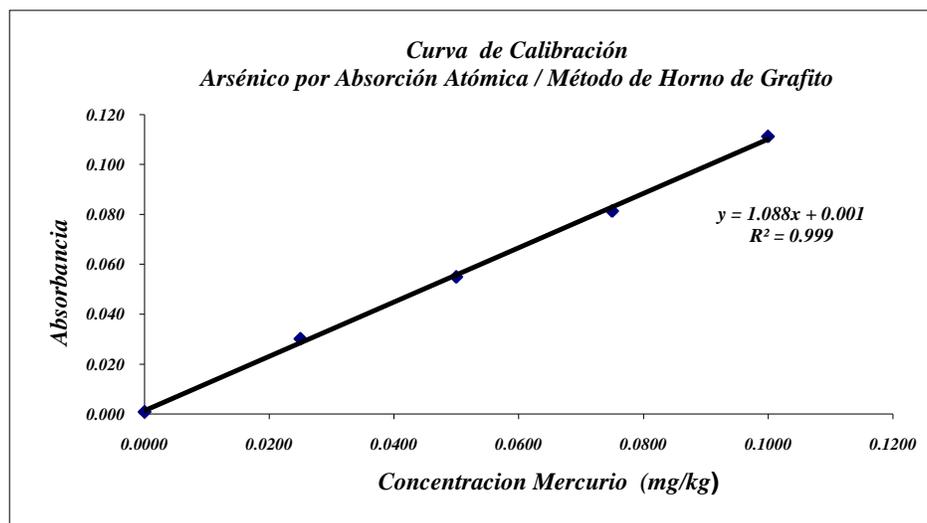


Fig.13 Representación gráfica de una curva de calibración para la determinación de arsénico en muestras de peces por absorción atómica demostrando la linealidad del método.

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para el grupo de datos de las 7 curvas de calibración a 5 niveles de concentración se obtiene que el F calculado para la serie de datos (a un nivel de confianza del 99.9%) y el F crítico de tablas no muestra que haya diferencia significativa entre medias de la serie de datos.

Tabla 19 Tabla de cálculos del análisis de varianza ANOVA de un factor para la determinación de plomo.

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	2.0113	0.40226	0.079213243
Columna 2	5	1.9727	0.39454	0.077023973
Columna 3	5	1.971	0.3942	0.077764425
Columna 4	5	1.939	0.3878	0.074502675
Columna 5	5	1.9197	0.38394	0.074372093
Columna 6	5	1.9398	0.38796	0.075062323
Columna 7	5	1.9148	0.38296	0.074547308
Columna 8	5	1.9213	0.38426	0.075401748

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001581264	7	0.000225895	0.002972849	0.999999987	2.312741187
Dentro de los grupos	2.431551152	32	0.075985974			
Total	2.433132416	39				

3.2.4 Exactitud del Método

Porcentaje de Recobro.

Se procede a realizar la determinación de arsénico en 10 muestras independiente del material de referencia DORM-3. Posteriormente se realiza la fortificación de la matriz a tres niveles de concentración dentro del rango de la curva de calibración. El cálculo del porcentaje de recobro se realizara de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{M_x \text{ Fortificada} - M_x \text{ No Fortificada}}{\text{Fortificación}} \times 100$$

Tabla 20 Porcentaje de recobro en material de referencia DORM-3 para arsénico.

Replicas	Concentracion Arsénico según certificado de Referencia. Valor Teórico [mg/L]	Concentracion Arsénico. Valor Práctico [mg/L]	% Recobro
1	6.8800	7.1997	104.6
2	6.8800	7.2355	105.2
3	6.8800	7.0046	101.8
4	6.8800	6.9923	101.6
5	6.8800	7.0912	103.1
6	6.8800	6.9992	101.7
7	6.8800	7.1860	104.4
8	6.8800	7.0860	103.0
9	6.8800	7.0080	101.9
PROMEDIO			103.0

Tabla 21 Nivel 1 Fortificación: 0.0500 mg/L de estándar de arsénico.

Replicas	Concentración Arsénico en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración Arsénico en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.0066	0.0529	92.6
2	0.0113	0.0651	107.6
3	0.0080	0.0546	93.2
4	0.0032	0.0496	92.8
5	0.0081	0.0693	122.4
6	0.0085	0.0636	110.2
7	0.0041	0.0638	119.4
8	0.0067	0.0523	91.2
9	0.0032	0.0646	122.8
10	0.0009	0.0649	128.0
PROMEDIO			108.0

Tabla 22 Nivel 2 Fortificación: 0.0700 mg/L de estándar de arsénico.

Replicas	Concentracion Arsénico en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentracion Arsénico en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.0066	0.0682	88.0
2	0.0113	0.0697	83.4
3	0.0080	0.0729	92.7
4	0.0032	0.0722	98.6
5	0.0081	0.0694	87.6
6	0.0085	0.0777	98.9
7	0.0041	0.0638	85.3
8	0.0067	0.0672	86.4
9	0.0032	0.077	105.4
10	0.0009	0.071	100.1
PROMEDIO			91.8

Tabla 23 Nivel 3 Fortificación: 0.0900 mg/L de estándar de arsénico.

Replicas	Concentracion Arsénico en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentracion Arsénico en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.0066	0.0911	93.9
2	0.0113	0.0939	91.8
3	0.0080	0.0934	94.9
4	0.0032	0.0793	84.6
5	0.0081	0.0812	81.2
6	0.0085	0.0851	85.1
7	0.0041	0.0878	93.0
8	0.0067	0.0897	92.2
9	0.0032	0.0961	103.2
10	0.0009	0.0921	101.3
PROMEDIO			92.1

Los valores obtenidos en los diferentes niveles de concentración en muestras de peces fueron: para el nivel 1 de concentración 0.0500 mg/L con 108.0 %; el nivel 2 de concentración 0.0700 mg/L con 91.8% y el nivel 3 de concentración 0.0900 mg/L con 92.1%. El recobro obtenido con el material de referencia es de 103.0% porcentaje muy aceptable según el certificado de referencia.

Los resultados reportados en la recuperación del analito (arsénico), muestran un porcentaje aceptable y que se encuentra dentro del rango establecido en la literatura, donde define a un porcentaje de recuperación aceptable del 80-120%.

3.3 VALIDACIÓN PARCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN ESPECIES MARINAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

3.3.1 Límite de detección y cuantificación.

Se prepararon 10 blancos independientes y se procedió a su lectura. El límite de detección y cuantificación se calculo en base a la desviación estándar de los resultados (So), donde: $LDD=3S_o$ y $LDC= \text{valor blanco}+10S_o$

Tabla 24 Límite de detección y cuantificación para la validación del método para la determinación de mercurio por AA

Identificacion	Resultado Practico [mg/L]
Blanco 1	0.0013
Blanco 2	0.0002
Blanco 3	0.0002
Blanco 4	0.0012
Blanco 5	0.0004
Blanco 6	0.0000
Blanco 7	0.0006
Blanco 8	0.0003
Blanco 9	0.0008
Blanco 10	0.0013
PROMEDIO	0.0006
MIN	0.0000
MAX	0.0013
DESV. STD. (So)	0.0005
LDD	0.0015
LDC	0.0056

Los valores reportados en las medidas de las repeticiones de los blancos, muestran que la concentración mínima detectable para la determinación de mercurio en matrices de peces es de 0.0015 mg/L y el valor mínimo cuantificable para la misma matriz es de 0.0056 mg/L. Lo cual se encuentra aceptable por comparación con los valores de concentraciones que se espera obtener en la validación del método.

3.3.2 Linealidad

A fin de evaluar la relación entre la señal analítica (y) y la concentración (x) se procede a realizar lecturas de 6 concentraciones del material estándar de referencia. Se hicieron tres lecturas de cada concentración preparadas de forma independiente y no de alícuotas de la misma solución madre.

Tabla 25 Valores obtenidos en el cálculo de la linealidad para la elaboración de una curva de calibración en la validación del método para la determinación de mercurio.

Concentracion Teorica de la solución estándar [mg/L]	Resultado Practico [mg/L]	Absorbancia (Abs)	Promedio de Absorbancia	Desviación Estándar Promedio	%CV
0.0005	0.00030	0.0054			
0.0005	0.00039	0.0069	0.006	0.0008	
0.0005	0.00088	0.0058			
0.0010	0.00640	0.0113			
0.0010	0.00650	0.0115	0.012	0.0004	3.58
0.0010	0.00680	0.0121			
0.0050	0.00475	0.0836			
0.0050	0.00472	0.0857	0.085	0.0013	1.58
0.0050	0.00461	0.0861			
0.0100	0.01150	0.1861			
0.0100	0.01150	0.1897	0.189	0.0021	1.10
0.0100	0.00997	0.1897			
0.0200	0.01911	0.3655			
0.0200	0.01968	0.3764	0.373	0.0066	1.77
0.0200	0.01972	0.3774			
0.0400	0.04034	0.7341			
0.0400	0.04032	0.7338	0.734	0.0009	0.12
0.0400	0.04041	0.7354			

El analista efectuó las repeticiones siguiendo el procedimiento descrito para el Método de Análisis de Mercurio por Absorción Atómica- Generador de Hidruros en muestras de origen marino.

Los porcentajes del coeficiente de variación obtenidos se encuentran dentro del rango que se estipula como aceptable en la literatura estadística menor al 5%.

3.3.3 Precisión del método.

a) Repetibilidad de Estándares

El estándar que se utilizó para la verificar la repetibilidad del método fue un estándar de 0.005 mg/L preparado a partir de Solución Estándar Certificada de Mercurio trazable a NIST 1000 mg/L en agua acidificada marca Merck.

Tabla 26 Repetibilidad de estándar de 0.005 mg/L de solución certificada de mercurio

Replica	Absorbancia	Resultado Practico [mg/L]
1	0.1132	0.0053
2	0.1171	0.0055
3	0.1225	0.0057
4	0.1097	0.0051
5	0.1016	0.0048
6	0.1087	0.0051
7	0.1192	0.0056
8	0.1165	0.0055
9	0.1117	0.0052
10	0.1138	0.0053
11	0.1145	0.0054
12	0.1079	0.0051
13	0.1165	0.0055
14	0.1193	0.0057
15	0.1165	0.0055
PROMEDIO	0.1139	0.0054
MIN	0.1016	0.0048
MAX	0.1225	0.0057
DESV. STD. (So)	0.0053	0.0003
RSD %	4.6888	4.7816

b) Repetibilidad de muestras (Material Certificado de Referencia DORM-3)

Valor según certificado	Límite inferior	0.382 mg/kg
0.409 +/- 0.027 mg/kg	Límite Superior	0.436 mg/kg

*Tabla 27 Repetibilidad del material de referencia certificado DORM-3
“Fish Protein Certified Referente Material for Trace Metals”*

Replica	Absorbancia	Resultado Practico [mg/L]	Resultado Práctico [mg/kg]
1	0.0782	0.0043	0.4099
2	0.0707	0.0039	0.3868
3	0.0716	0.0040	0.3970
4	0.0731	0.0040	0.3990
5	0.0721	0.0040	0.3922
6	0.0698	0.0037	0.3695
7	0.0679	0.0038	0.3798
8	0.0670	0.0037	0.3699
9	0.0685	0.0038	0.3799
PROMEDIO	0.0710	0.0039	0.3871
MIN	0.0670	0.0037	0.3695
MAX	0.0782	0.0043	0.4099
DESV. STD. (So)	0.0034	0.0002	0.0137
RSD %	4.7565	4.8587	3.5347

De los resultados tabulados en la tabla 27 se observan que los valores de desviación estándar y RSD para la serie de datos es menor del 5%, por lo tanto se acepta que el método es preciso.

c) Reproducibilidad de las curvas de calibración.

Se estimó la precisión del método mediante la reproducibilidad de las curvas de calibración, para lo cual se procedió a la lectura de 7 preparaciones independientes de un material de un estándar de referencia a 5 niveles de concentración. Las preparaciones y lecturas las efectuó

el analista titular, utilizando la misma solución patrón de mercurio, equipo y en días diferentes.

De las 7 curvas de calibración se calculo el promedio, la desviación estándar y el RSD de las absorbancias generadas por cada nivel de concentración.

Los resultados se tabulan a continuación:

Tabla 28 Curvas de calibración para el cálculo de la reproducibilidad.

Solución Estándar [mg/L]	Curva 1 (Abs)	Curva 2 (Abs)	Curva 3 (Abs)	Curva 4 (Abs)	Curva 5 (Abs)	Curva 6 (Abs)	Curva 7 (Abs)	Promedio	Desviación Estándar	RSD %
0.000	0.0022	0.0033	0.0024	0.0045	0.0048	0.0046	0.0002	0.003	0.0017	
0.001	0.0233	0.0224	0.0223	0.0216	0.0207	0.0216	0.0239	0.022	0.0011	4.89
0.005	0.1080	0.1055	0.1059	0.1048	0.1021	0.1048	0.0967	0.104	0.0037	3.51
0.010	0.2142	0.2126	0.2106	0.2090	0.2069	0.2085	0.2035	0.209	0.0036	1.71
0.020	0.4260	0.4208	0.4220	0.4190	0.4188	0.4132	0.3938	0.416	0.0110	2.55

A continuación se muestran las diferentes curvas de calibración:

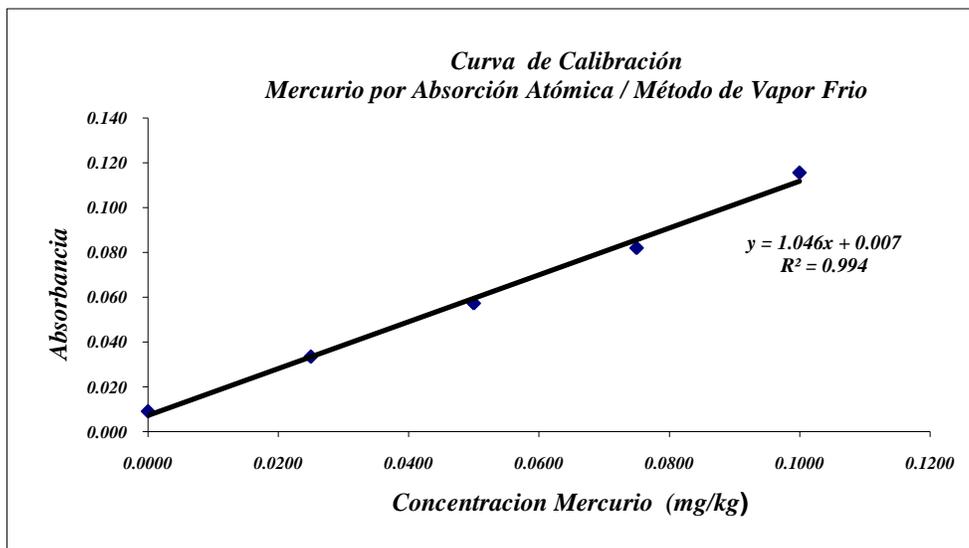


Fig. 14 Representación gráfica de una curva de calibración para la determinación de mercurio en muestras de peces por absorción atómica demostrando la linealidad del método.

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para el grupo de datos de las 7 curvas de calibración a 5 niveles de concentración se obtiene que el F calculado para la serie de datos (a un nivel de confianza del 99.9%) y el F crítico de tablas no muestra que haya diferencia significativa entre medias de la serie de datos.

Tabla 29 Tabla de cálculos del análisis de varianza ANOVA de un factor para la determinación de mercurio.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	5	0.7737	0.15474	0.029961758		
Columna 2	5	0.7646	0.15292	0.029247917		
Columna 3	5	0.7632	0.15264	0.029414843		
Columna 4	5	0.7589	0.15178	0.028881502		
Columna 5	5	0.7533	0.15066	0.028896203		
Columna 6	5	0.7527	0.15054	0.028091448		
Columna 7	5	0.7151	0.14302	0.026119407		
Columna 8	5	0.6493	0.12986	0.022094783		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00236128	7	0.000337326	0.012117245	0.999998321	2.312741187
Dentro de los grupos	0.890831444	32	0.027838483			
Total	0.893192724	39				

3.3.4 Exactitud del Método

Porcentaje de Recobro.

Se procede a realizar la determinación de mercurio en 10 muestras independiente del material de referencia DORM-3. Posteriormente se realiza la fortificación de la matriz a tres niveles de concentración dentro del rango de la curva de calibración.

Tabla 30 Porcentaje de recobro en DORM-3 para mercurio.

Replicas	Concentración Mercurio según certificado de Referencia. Valor Teórico [mg/L]	Concentración Mercurio. Valor Práctico [mg /L]	% Recobro
1	0.4090	0.4099	100.2
2	0.4090	0.3868	94.6
3	0.4090	0.3970	97.1
4	0.4090	0.3990	97.5
5	0.4090	0.3922	95.9
6	0.4090	0.3695	90.3
7	0.4090	0.3798	92.9
8	0.4090	0.3699	90.4
9	0.4090	0.3799	92.9
PROMEDIO			94.6

Tabla 31 Nivel 1 Fortificación: 0.0010 mg/L de estándar de mercurio.

Replicas	Concentración Mercurio en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración Mercurio en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.0040	0.0046	60.0
2	0.0040	0.0048	80.0
3	0.0040	0.0049	90.0
4	0.0040	0.0049	90.0
5	0.0040	0.0049	90.0
6	0.0040	0.0049	90.0
7	0.0030	0.0049	190.0
8	0.0040	0.0049	90.0
9	0.0040	0.0050	100.0
10	0.0040	0.0044	40.0
PROMEDIO			92.0

Tabla 32 Nivel 2 Fortificación: 0.0050 mg/L de estándar de mercurio.

Replicas	Concentración Mercurio en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración Mercurio en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.0050	0.0090	80.0
2	0.0040	0.0080	80.0
3	0.0040	0.0080	80.0
4	0.0040	0.0080	80.0
5	0.0040	0.0090	100.0
6	0.0040	0.0090	100.0
7	0.0030	0.0080	100.0
8	0.0040	0.0080	80.0
9	0.0040	0.0080	80.0
10	0.0040	0.0090	100.0
PROMEDIO			86.7

Tabla 33 Nivel 3 Fortificación: 0.010 mg/L de estándar de mercurio.

Replicas	Concentración Mercurio en matriz de peces sin fortificar [mg/L]	Concentración Mercurio en matriz fortificada [mg/L]	% Recobro
1	0.0050	0.0127	77.0
2	0.0040	0.0125	85.0
3	0.0040	0.0133	93.0
4	0.0040	0.0133	93.0
5	0.0040	0.0133	93.0
6	0.0040	0.0132	92.0
7	0.0030	0.0133	103.0
8	0.0040	0.0133	93.0
9	0.0040	0.0132	92.0
10	0.0040	0.0133	93.0
PROMEDIO			91.4

Los valores obtenidos en los diferentes niveles de concentración en muestras de peces fueron: para el nivel 1 de concentración 0.05 mg/L con 92.0 %; el nivel 2 de concentración 0.07 mg/L con 86.7% y el nivel 3 de concentración 0.09 mg/L con 91.4%. El recobro obtenido en el material certificado de referencia es de 94.6%, resultado que se encuentra dentro del rango aceptable de porcentajes de recobro.

Los resultados reportados en la recuperación del analito, muestran un porcentaje aceptable y que se encuentran dentro del rango establecido en la guía de validación de métodos donde define a un porcentaje (%) de recuperación aceptable del 80-120%.

3.4 DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN MUESTRAS REALES.

El proceso final del estudio consistió en la recolección de una serie de muestras en el departamento de la Libertad.

De cada especie se recolectaron entre 5 y 7 muestras, las cuales se lavaron con agua desionizada y fueron guardadas en bolsas plásticas selladas de polietileno aproximadamente a una temperatura de 20°C en un recipiente térmico. Cada muestra se clasifico por especie, tamaño y peso, del total de la muestra se selecciono la parte a utilizar (músculo de pescado y vísceras), se homogenizó a fin de obtener una muestra representativa para medir el grado de contaminación. El procedimiento para la determinación de los contaminantes se realizó de la siguiente manera:

3.4.1 Determinación de arsénico, plomo y mercurio por Espectrometría de Absorción Atómica.

Se peso aproximadamente 0.5 ± 0.15 g de la muestra en un vaso digestor, se adiciono 10.0 mL de ácido nítrico concentrado y se cerró el vaso digestor. Se colocó en el recipiente

del digestor y se programó las rampas de temperatura según el método descrito en la sección 2.1.1

Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente, transfiriéndolo a un balón de 50 mL y aforando con agua desionizada. Finalmente se midió la concentración de metales de interés para cada muestra digerida por duplicado en un espectrómetro de Absorción Atómica.

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos por tres especies diferentes de peces recolectados en el departamento de la Libertad, a cada muestra se le determinó el grado de contaminación por arsénico, plomo y mercurio.

Tabla 34 Concentraciones, pesos y tamaños del músculo de pescado recolectado en el Puerto de La Libertad para la determinación de metales pesados por espectrometría de absorción atómica.

MÚSCULO DE PECES (Pargo ¹ , Curvina ² y Bagre ³)									
Codigo de la muestra	[As](mg/kg)	Promedio (mg/kg)	[Pb](mg/kg)	Promedio (mg/kg)	[Hg](mg/kg)	Promedio (mg/kg)	Peso Muestra (g)	Tamaño (cm)	Peso (g)
2008-P1	1.4863	1.5139	0.1525	0.1668	0.0692	0.0707	0.5247	29.5	280.0
2008-P1	1.5414		0.1811		0.0723		0.5247	29.5	280.0
2008-P2	1.9716	2.1230	0.1101	0.1135	0.0605	0.0628	0.5385	32.0	290.0
2008-P2	2.2743		0.1169		0.0650		0.5385	32.0	290.0
2008-P3	0.6289	0.7528	0.065	0.0718	0.0540	0.0545	0.6358	31.0	340.0
2008-P3	0.8767		0.0786		0.0550		0.6358	31.0	340.0
2008-P4	2.8147	2.8462	0.3805	0.3978	0.1239	0.1282	0.5782	33.0	310.0
2008-P4	2.8777		0.4151		0.1325		0.5782	33.0	310.0
2008-P5	1.4020	1.4299	0.0836	0.0868	0.0450	0.0461	0.5560	29.0	250.0
2008-P5	1.4578		0.0899		0.0472		0.5560	29.0	250.0
2008-C1	0.4326	0.4415	0.0975	0.0975	0.0687	0.0695	0.5999	20.0	63.0
2008-C1	0.4503		0.0975		0.0702		0.5999	20.0	63.0
2008-C2	4.3007	4.3132	0.3625	0.3857	0.1419	0.1419	0.5663	20.5	87.0
2008-C2	4.3257		0.4089		0.1419		0.5663	20.5	87.0
2008-C3	5.1124	5.3231	0.9335	0.9418	0.1678	0.1722	0.6406	22.0	92.0
2008-C3	5.5339		0.9502		0.1766		0.6406	22.0	92.0
2008-C4	0.7249	0.7435	0.0156	0.0195	0.0781	0.0797	0.5380	19.5	64.0
2008-C4	0.7621		0.0234		0.0813		0.5380	19.5	64.0
2008-C5	0.4965	0.5453	0.2737	0.2914	0.1301	0.1301	0.5639	24.0	70.0
2008-C5	0.5941		0.3090		0.1301		0.5639	24.0	70.0
2008-B1	2.7251	2.7742	0.1662	0.1794	0.0464	0.0504	0.5385	36.0	260.0
2008-B1	2.8232		0.1925		0.0543		0.5385	36.0	260.0
2008-B2	3.7962	3.8056	0.6500	0.6631	0.0962	0.0975	0.5715	35.0	310.0
2008-B2	3.8150		0.6761		0.0987		0.5715	35.0	310.0
2008-B3	7.8040	7.8871	0.7428	0.7433	0.1233	0.1233	0.5012	43.0	508.0
2008-B3	7.9703		0.7437		0.1233		0.5012	43.0	508.0
2008-B4	4.2968	4.3397	0.4789	0.5138	0.0996	0.1029	0.5177	36.0	322.0
2008-B4	4.3825		0.5487		0.1062		0.5177	36.0	322.0
2008-B5	2.2219	2.2775	0.2201	0.2289	0.0798	0.0798	0.5679	38.0	290.0
2008-B5	2.3332		0.2377		0.0798		0.5679	38.0	290.0

¹ P1-: corresponde a la especie *Lutjanus Specium* de nombre común Pargo

² C1: corresponde a la especie *Pachyurus Bonariensis Specium* de nombre común Curvina

³ B1: corresponde a la especie *Arius, Cathorops Specium* de nombre común Bagre

Los valores en el arsénico oscilaron entre 0.44 y 7.88 mg/kg de peso para las distintas muestras analizadas. Los valores más elevados los presentaron las muestras de bagre (*Arius*, *Cathorops Specium*), tanto la curvina (*Pachyurus Bonariensis Specium*) como el pargo (*Lutjanus Specium*) lanzaron resultados arriba del límite permisible. Los niveles de plomo reflejaron variaciones en los valores entre muestras de la misma especie, las muestras oscilaron entre 0.019 y 0.941 mg/kg peso. Las concentraciones más elevadas de plomo se encontraron en las muestras de bagre, concretamente en las muestras de mayor tamaño.

Para el mercurio, los niveles obtenidos oscilaron entre 0.046 y 0.172 mg/kg peso, reflejaron pequeñas variaciones entre si las muestras analizadas, sin embargo, ninguna de las muestras sobrepaso los límites permisibles.

Tabla 35 Tabla resumen de concentraciones y pesos de vísceras recolectadas en el Puerto de La Libertad para la determinación de metales pesados por AA.

VÍSCERAS DE PECES (Pargo y Curvina)							
Código de la muestra	[As](mg/kg)	Promedio (mg/kg)	[Pb](mg/kg)	Promedio (mg/kg)	[Hg](mg/kg)	Promedio (mg/kg)	Peso Mx (g)
2008-VP1	0.4242	0.4180	0.1527	0.1466	0.1527	0.1559	0.5894
2008-VP1	0.4119		0.1404		0.1591		0.5341
2008-VP2	13.9879	13.4875	0.0663	0.0699	0.1327	0.1307	0.5276
2008-VP2	12.9871		0.0735		0.1287		0.5440
2008-VP3	9.0275	10.5742	0.1673	0.1723	0.0279	0.0287	0.5378
2008-VP3	12.1209		0.1772		0.0295		0.5078
2008-VP4	5.7006	4.8537	0.5681	0.5658	0.0997	0.0983	0.5017
2008-VP4	4.0067		0.5636		0.0969		0.5678
2008-VP5	0.1051	0.1641	0.2961	0.3014	0.0478	0.0471	0.5234
2008-VP5	0.2230		0.3067		0.0465		0.5380
2008-VC1	8.4192	7.5293	0.1944	0.1730	0.1069	0.0876	0.5143
2008-VC1	6.6394		0.1516		0.0682		0.6597
2008-VC2	5.7084	6.0361	3.6627	3.8963	0.1697	0.1881	0.5597
2008-VC2	6.3638		4.1299		0.2065		0.5327
2008-VC3	3.7060	4.5549	0.2604	0.2284	0.0781	0.0734	0.5761
2008-VC3	5.4038		0.1965		0.0688		0.5089
2008-VC4	8.9636	7.5210	1.1004	0.9914	0.2101	0.2129	0.4998
2008-VC4	6.0784		0.8824		0.2157		0.5100
2008-VC5	7.9086	8.3692	1.6988	1.7440	0.1227	0.1195	0.5298
2008-VC5	8.8298		1.7892		0.1163		0.5589

VP1: corresponde al código de la muestra de vísceras de peces para la especie de pargo.
 VC1: corresponde al código de la muestra de vísceras de peces para la especie de curvina.

Los valores del arsénico para las muestras de vísceras oscilaron entre 0.10 y 13.98 mg/kg de peso fresco. Los valores más elevados los presentaron las muestras de pargo (*Lutjanus Specium*), las cuales presentaron valores arriba de los permitidos por la normativa; la curvina (*Pachyurus Bonariensis Specium*) mostro resultados bastante arriba del límite permisible según normativa.

Los niveles de plomo presenta algunas variaciones entre valores de muestras de la misma especie, los resultados oscilaron entre 0.06 y 3.66 mg/kg en peso fresco. Las concentraciones más elevadas de plomo se encontraron en las muestras de curvina.

Para el mercurio, los niveles obtenidos oscilaron entre 0.02 y 0.21 mg/kg en peso fresco, reflejaron variaciones entre si las muestras analizadas, sin embargo, ninguna de las muestras sobrepaso los límites permisibles.

CAPITULO 4 “CONCLUSIONES”

4.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS.

Las pruebas realizadas en la determinación del ámbito lineal para la validación de plomo, muestran que este metal no tiende a la linealidad, los datos reportados permiten concluir que el plomo sigue la ecuación $aX^2 + bX + c$. Su no linealidad permite que el porcentaje del RSD sea mayor al 5%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que los métodos empleados para la determinación de plomo, arsénico y mercurio en muestras de peces da como certeza que dichas metodologías son las pertinentes para la determinación de estos metales pesados, esto se puede comprobar con los valores obtenidos en la exactitud de método y en el porcentaje de recobro, que permiten demostrar que los valores son aceptables según la certificación por la NRC en su material de referencia certificado DORM-3.

La precisión de los métodos fue establecida por un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 porciento en el cual se obtuvo un F_{calc} menor al F_{tabulado} lo que determina que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos y que el método es totalmente reproducible con los parámetros definidos en los protocolos de validación estipulados.

En los métodos para la determinación de mercurio y arsénico, muestran un comportamiento lineal en las medidas repetidas de las diferentes concentraciones para la construcción de su curva de calibración; el RSD obtenido en cada uno de los métodos es menor al 5%.

4.2 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE METALES PESADOS EN MUESTRAS DE PESCADOS

Se observó que cada una de las muestras tomada en el puerto de la libertad contenían diferentes concentraciones a pesar de haber sido muestreadas en una misma zona, por lo que no se puede hacer ningún tipo de relación entre el lugar de muestreo y su nivel de concentración.

Los resultados obtenidos como se muestra en la tabla 34 indican que el bagre (*Arius, Cathorops Specium*) es por su concentración encontrada de arsénico y plomo el producto pesquero que podrían conllevar a un mayor riesgo toxicológico. Sin embargo, para alcanzar las ISTP establecidas por la FAO/OMS sería necesario el consumo de estos productos en cantidades muy superiores al consumo medio de productos pesqueros (3,5 g/día). En consecuencia, no parece existir un riesgo para la salud derivado de la ingesta de los productos analizados.

Por lo que respecta a las consideraciones legislativas, algunos de los productos analizados en este muestreo han cumplido con las legislaciones vigentes en El Salvador (Norma Salvadoreña del Conacyt NSO 67.32.01:08 Reglamento de la Unión Europea 1881 / 2006 / CE y Reglamento (CE) 333 / 2007). Algunas de las muestras analizadas alcanzaron valores por encima de los límites establecidos por la Legislación, para el Pb y As en productos de la pesca.

En el caso del arsénico, la Norma Salvadoreña del Conacyt al igual que el reciente Reglamento de la Comisión Europea no tiene vigente una normativa para este tipo de contaminante. Actualmente, sólo Australia y Nueva Zelanda limitan a 1.5 mg/kg peso fresco los contenidos de arsénico inorgánico en productos de la pesca. Si este límite máximo fuese adoptado por la Unión Europea al igual que por El Salvador, algunos de los productos pesqueros analizados podrían ser comercializados.

En base a los contenidos de metales pesados los datos son útiles desde el punto de vista medioambiental, al indicar los productos que presentan mayor tendencia a acumular un determinado contaminante, independientemente de la forma química en que este se encuentre. El bagre es el producto de pesca que mayor acumulación han evidenciado, por lo que podría considerarse su empleo como bioindicadores de la contaminación del medio por diferentes metales pesados.

No se ha encontrado, en general, una relación directa entre los contenidos de arsénico, plomo y mercurio y el tamaño de las especies muestreadas, sin embargo, existe un pequeño indicio que el peso y tamaño de la muestra influye en la acumulación de dichos contaminantes, no obstante en este estudio no se puede concluir que ese sea un parámetro fundamental en lo que respecta a concentraciones.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] División Cinética Química. Centro Atómico Bariloche. Argentina 2007.
http://www.cab.cnea.gov.ar/cab/cq/material/absorc_atom.pdf
- [2] Turkmen A., Turkmen M., Tepe Y., Akyurt I. (2005). Analytical, Nutricional and Clinical Methods. “*Heavy Metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey*”
- [3] Veterinary Laboratories Agency, Analytical Chemistry Unit (SOP ACU/0289). “*Validation Document. Analysis of Arsenic in Tissues by Vapour Generation Atomic by Vapour Generation Atomic Absorption Spectrophotometry*”
- [4] Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Escuela de Química (2002) “*Validación de Metodo para la determinación de mercurio en ríos de la zona metropolitana de San Salvador por espectrometría Ultravioleta*”.
- [5] Ferrari Mirtha, Ramos Luis Daniel, (1994). *Monografía: Contaminantes Químicos*, Tegucigalpa, Honduras.
- [6] Norberto I. Schinitman. (2004). “*Metales Pesados, Ambiente y Salud*”.
<http://www.ecoportel.net/content/view/full/37424>
- [7] “*Metales Pesados y Arsénico*” http://www.euskadi.net/r33-2288/eu/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/eu_1247/adjuntos/vigila9508.pdf
- [8] *Programa Internacional de Seguridad Química. 2006 (IPCS)*.
<http://www.who.int/ipcs/en/>
- [9] “*Mercurio Mineral y Mercurio Orgánico*” 2006.
<http://www.consumaseguridad.com/ciencia-y-tecnologia/2002/02/06/69>
- [10] ATSDR “*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*”. 1999
- [11] “*Metales pesados*” <http://www.lenntech.com/espanol/metales%20pesados.htm>

- [12] Los Cués, Qro. México 2ª Edición (2005). “*Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*” EURACHEM. Traducción de la obra original en inglés The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- [13] NATA Tech Note # 13. EURACHEM. Traducción de la obra original en inglés The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurachem.
- [14] AOAC “Methods of Analysis of the Association of Official Chemist”
- [15] Rubinson J. F. , Rubinson K. A. (2000) *Química Analítica Contemporánea* (1ª. Edición). Pearson Educación. Prentice Hall. México 100-103.
- [16] Strobel A. Howard (1968) *Intrumentación Química* (1ª. Edición). Editorial Limusa Wiley. S. A. México. Emisión y Absorción de EM, 83, 173.
- [17] Miller, James N. , Miller, Jane C. *Estadística y Quimiometría para química analítica*. Pearson Educación S.A Madrid 2002. 21-72
- [18] Helrich, Kl, Editor. Methods of Analysis of the Association of Official Chemist. 15 th edition. Arlington VA: AOAC (2005) “Metal and Other Elements” Método Oficial 974.14. Capítulo 9, Pág. 37