

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL
SEDE DE ATENAS

ÁREA DE TECNOLOGÍA
INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE
MERCURIO EN ATÚN EN CONSERVA, EN EL CENTRO NACIONAL DE
REFERENCIA EN BROMATOLOGÍA DEL INCIENSA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

GINNETTE MARÍA BADILLA NÚÑEZ
KIMBERLY MARÍA CAMPOS MENA

ATENAS, COSTA RICA

2018

DECLARACIÓN JURADA

Nosotras Ginnette María Badilla Núñez portadora de la cédula de identidad número 3-0439-0439 y Kimberly María Campos Mena portadora de la cédula de identidad número 2-0710-0889, estudiantes de la Universidad Técnica Nacional (UTN), en la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, conocedora (s) de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional (UTN), así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los 19 días del mes de diciembre del dos mil dieciocho.



Ginnette María Badilla Núñez
Cédula 3-0439-0439



Kimberly María Campos Mena
Cédula 2-0710-0889

HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos

EAL 11

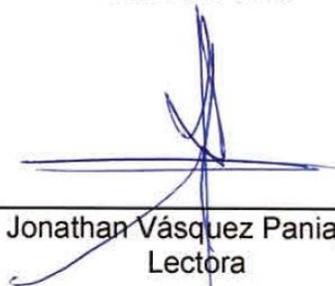
Eduardo Barrantes Guevara
Director Investigación Sede Atenas

A. Bárceño

Ana María Bárcenas Parra
Directora de Carrera



Adrián Roda Brenes
Tutor del TFG



Jonathan Vásquez Paniagua
Lectora



Óscar Fernández Sánchez
Representante del Inciensa

Dedicatoria

A Dios, a mi mamá y a toda mi familia por su apoyo incondicional.

Ginnette María Badilla Núñez

A mis padres Egberto Alejandro Campos Álvarez e Ivonne del Socorro Páez Álvarez, por su ayuda y motivación. Y en especial, a mi tío Moisés Antonio Campos Álvarez por su apoyo incondicional desde siempre.

Kimberly María Campos Mena

Agradecimientos

Agradecemos profundamente al Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) por habernos dado la oportunidad de desarrollar nuestro Trabajo Final de Graduación en sus instalaciones, específicamente en el Centro Nacional de Referencia Bromatología (CNRBRO).

A Thelma Alfaro Calvo, coordinadora del CNRBRO por haber confiado en nosotras y apoyarnos continuamente en el desarrollo del proyecto.

A Óscar Fernández Sánchez, quien fungió como nuestro guía dentro del CNRBRO, por el aporte de sus conocimientos, dedicación y paciencia durante el desarrollo del Trabajo Final de Graduación.

A nuestro tutor Adrián Roda Brenes, por su ayuda desinteresada e importante en la realización de esta investigación, por el tiempo dedicado a guiarnos y aconsejarnos, así como motivarnos a concluir nuestro Trabajo Final de Graduación.

A Jonathan Vásquez Paniagua por haber aceptado ser lector de nuestro Trabajo Final de Graduación, y haber aportado su conocimiento en la mejora de nuestro proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de cuadros.....	viii
Tabla de gráficas.....	ix
Resumen.....	x
I Introducción.....	12
1.1 Antecedentes.....	12
1.2 Descripción de la problemática.....	16
1.3 Justificación.....	17
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo General.....	18
1.4.2 Objetivos Específicos.....	18
1.5 Alcance y limitaciones.....	19
1.6 Referente institucional.....	19
II Marco Teórico.....	21
2.1 El Mercurio como Contaminante en los Alimentos.....	21
2.1.1 El mercurio: características generales.....	21
2.1.2 Especies químicas del mercurio.....	21
2.1.3 Fuentes de exposición del mercurio.....	22
2.1.4 Mercurio en agua.....	23
2.1.5 Toxicidad del mercurio en el cuerpo humano y los alimentos.....	24
2.1.6 Procesamiento del atún.....	25
2.2 El Mercurio como Contaminante en el Atún.....	26
2.2.1 Exposición humana.....	26
2.2.2 Situación del mercurio en Costa Rica.....	27
2.3 Tipos de atún.....	28
2.3.1 Comercialización del atún.....	29
2.4 Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado.....	31
2.5 Metodologías para la validación de métodos.....	31
2.5.1 Validación.....	31

2.5.2	Metodologías analíticas consultadas para la validación de métodos de ensayo	34
2.5.2.1	Guía de validación de la Eurachem	34
2.5.2.2	Guía de validación del Organismo Argentino de Acreditación	36
2.5.2.3	Guía de validación del Ente Costarricense de Acreditación	37
III	Marco Metodológico	49
3.1	Introducción.....	49
IV	Análisis de resultados	60
4.1	Identificación de Metodologías Analíticas	60
4.2	Descripción de metodologías	63
4.3	Propuesta de procedimiento analítico	64
4.4	Validación de procedimiento analítico	66
4.4.1	Veracidad.....	66
4.4.2	Repetibilidad (r).....	68
4.4.3	Reproducibilidad (R)	69
4.4.4	Límite de detección (LOD)	72
4.4.5	Límite de cuantificación (LOQ).....	73
4.4.6	Rango	74
4.4.7	Linealidad.....	76
4.4.8	Incertidumbre	79
4.4.9	Efecto matriz y Selectividad	85
4.4.10	Robustez.....	87
4.5	Muestras en el mercado	92
4.6	Documentación asociada a la validación	95
V	Conclusiones y recomendaciones.....	96
VI	Referencias	98
VII	Glosario.....	104
VIII	Anexos	106
	Anexo 1 Operación del Digestor de Microondas	106

TABLA DE CUADROS

Tabla 1 Curva de calibración.....	56
Tabla 2 Resumen de las metodologías para determinar mercurio en alimentos .	63
Tabla 3 Condición de la evaluación del Z Score	66
Tabla 4 Resultados de muestras Interlaboratorio FAPAS	67
Tabla 5 Resultados de FAPAS	67
Tabla 6 Cálculos para repetibilidad	68
Tabla 7 Cálculos para reproducibilidad	70
Tabla 8 Prueba de homogeneidad de varianzas	70
Tabla 9 Resumen de la prueba de homogeneidad.....	70
Tabla 10 Datos para calcular la reproducibilidad.....	71
Tabla 11 Resultados para reproducibilidad	71
Tabla 12 Comparación de reproducibilidad	71
Tabla 13 Promedio general para reproducibilidad.....	71
Tabla 14 Relación con HorRat	72
Tabla 15 Cálculo para límite de detección.....	72
Tabla 16 Cálculo para límite de cuantificación	74
Tabla 17 Cálculo para Rango.....	75
Tabla 18 Datos para calcular la hipótesis.....	75
Tabla 19 Cálculo para linealidad	76
Tabla 20 Análisis de varianza.....	77
Tabla 21 Estimación del aporte de incertidumbre	80
Tabla 22 Distribución gaussiana	80
Tabla 23 Distribución triangular	80
Tabla 24 Distribución rectangular.....	81
Tabla 25 Distribución gaussiana	81
Tabla 26 Distribución gaussiana	81
Tabla 27 Datos para la incertidumbre.....	82
Tabla 28 Cálculos para incertidumbre	82
Tabla 29 Resultado por Monte Carlo.....	83
Tabla 30 Resultado por GUM.....	83
Tabla 31 Resultado por GUM.....	83
Tabla 32 Cálculos para Efecto matriz y selectividad	85
Tabla 33 Resultados para Efecto matriz y Selectividad.....	85
Tabla 34 Comparación entre tilapia enriquecida y una muestra blanco	86
Tabla 35 Resultados para Robustez	88
Tabla 36 Prueba F para varianzas	88
Tabla 37 Resumen de las variables	89
Tabla 38 Resultados obtenidos para cada parámetro de validación	90
Tabla 39 Identificación de las muestras	92

TABLA DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Modelo de calibración	66
Gráfica 2 Residuales para veracidad.....	66
Gráfica 3 Efecto del cambio de variables	87
Gráfica 4 Resultados de las muestras analizadas.....	93
Gráfica 5 Procedencia de las muestras de atún.....	94

RESUMEN

Esta investigación tiene como objetivo principal realizar la validación de un método analítico cuantitativo para determinar mercurio en atún en conserva, por medio de la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica por Generación de Hidruros Volátiles. La validación se desarrolló en el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) específicamente en el Centro Nacional de Referencia en Bromatología (CNRBRO).

Para realizar dicha validación, se procedió a buscar información en normas, reglamentos, decretos, libros, revistas y artículos científicos, así como documentos internos del INCIENSA. Una vez que se recolectó información referente al tema de estudio, se seleccionó aquella más aplicable al objeto de investigación y se elaboró un plan de trabajo; posteriormente, se realizaron diferentes capacitaciones para familiarizarnos con el uso de los equipos.

El proceso de validación se realizó utilizando como referencia el método AOAC 971.21 Mercurio en Alimentos y el procedimiento INCIENSA PG14 Validación o verificación de métodos que establece cuáles se deben evaluar dependiendo de la técnica a validar. En este caso, el método es normalizado modificado, por lo tanto los criterios de validación y sus resultados fueron: Ámbito de trabajo o Rango el cual es de 86,3-1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Efecto matriz/Selectividad: $F \leq F_{\text{crit}}$, es decir, los resultados obtenidos deben estar libres de interferencias matriciales o espectrales, donde la evaluación de blancos de matriz y muestras o estándares para verificar que la respuesta sea única al analito, Incertidumbre: 12,2%, Linealidad $R_2 \leq 0,995$, Límite de cuantificación: 86,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Límite de detección: 25,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Repetibilidad: 0,552, Reproducibilidad: 0,887, Robustez: $F \leq F_{\text{crit}}$, la cual se traduce como ANOVA de un factor, donde no existe afectación en la variable observada y Veracidad 344,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un Z score de 0,8. Cada parámetro se evaluó de forma detallada y se analizó estadísticamente, para dar validez a los análisis se utilizó Material de Referencia Certificado ERM-BB442 (European Reference Materials): $(0,601 \pm 0.030)$ mg/kg , patrón de calibración de Hg^{2+} : (1000 ± 4) mg/l preparado 12 % HNO_3 m/m, como muestra blanco se utilizó tilapia cultivada en agua dulce y se participó en una ronda interlaboratorio FAPAS

07309, además, se usó el *RTCR 409: 2008 Reglamento de Límites Máximos Microbiológicos y de Residuos de Medicamentos y Contaminantes para los Productos y Subproductos de la Pesca y de la Acuicultura Destinados al Consumo Humano, decreto N° 32368 del MAG* como referencia para conocer los niveles máximos permitidos de mercurio en atún en nuestro país el cual es de 1 mg/kg, después del análisis de cada parámetro los resultados obtenidos son aceptables para todos los criterios, por lo tanto, se considera la validación como satisfactoria.

Una vez que se validó la técnica seleccionada se realizaron estudios a muestras de atún en conserva provenientes de diferentes comercios, el muestreo estuvo a cargo del Ministerio de Salud (MS) quien, en su papel de entidad reguladora, se encarga de visitar los comercios, recoger muestras y enviarlas al INCIENSA. Posteriormente, el CNRBRO se encarga de realizar el análisis químico correspondiente y enviar el resultado al MS como parte del programa de vigilancia.

Del total de muestras analizadas, el 100% obtuvo resultados debajo del valor máximo permitido por la norma, por lo que se consideran resultados conformes. Se dio un comportamiento de resultados por debajo de los 300 mg/kg, pues el 93% de las muestras analizadas se clasifica dentro de este rango, únicamente el 7% de las muestras tuvo valores arriba de 0,5 mg/kg.

En cuanto al país de procedencia, la mayoría de las muestras provienen de Tailandia, otras muestras vienen de Ecuador, México, Costa Rica, incluso algunas no declaran país de origen.

I INTRODUCCIÓN

Este capítulo se divide en seis sesiones, iniciando por los antecedentes, donde se detalla la situación actual en Costa Rica sobre el consumo y la comercialización del atún en conserva, además, se menciona cómo el mercurio llega a bioacumularse en el atún cuando este se encuentra en su hábitat natural, y algunos casos por intoxicación de mercurio al ingerir alimentos contaminados con este metal.

En la descripción de la problemática se explica con claridad, el principal motivo del desarrollo de esta investigación. Dentro de la justificación se tiene la importancia de validar un método analítico y en los objetivos se reflejan los pasos a seguir para lograr esta validación. En el alcance se especifica hasta donde se va a abordar este proyecto, en las limitaciones se detalla cuáles fueron algunas circunstancias presentes antes, durante y después de realizar este estudio y, por último, en la reseña histórica se comenta un poco de los inicios del INCIENSA, la misión y visión de la empresa.

1.1 Antecedentes

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el mercurio se clasifica entre uno de los diez grupos químicos que pueden causar más problemas de salud pública, por ello es que existen documentos como el *RTCR 409: 2008 Reglamento de Límites Máximos Microbiológicos y de Residuos de Medicamentos y Contaminantes para los Productos y Subproductos de la Pesca y de la Acuicultura Destinados al Consumo Humano, decreto N° 34687-MAG* que establecen los límites máximos permitidos para diferentes contaminantes, esto significa que en Costa Rica se tiene un documento oficial al que no se le saca el mejor provecho, ya que no se da la vigilancia correspondiente por el ente responsable, cabe resaltar que el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), realiza este tipo de análisis pero en pescado fresco no en atún en conserva, los análisis realizados por el MAG, están respaldados por estudios de más de diez años que dan confiabilidad en los resultados, sin embargo, el MS debe cumplir su función de vigilancia y prevención, esto respalda la necesidad de validar esta técnica.

En los últimos diez años, en Costa Rica, se ha dado un crecimiento significativo en la ingesta de atún en conserva. Una de las principales razones para tal situación es la apertura de mercado, la cual lleva al ingreso de numerosas marcas comerciales de distintos países, con una extensa variedad de presentaciones disponibles en los supermercados costarricenses, a precios accesibles para el consumidor.

Otras causas del incremento del consumo de dicho alimento se debe a su agradable sabor y facilidad de consumo; actualmente, el estilo de vida de los costarricenses hace que se prefieran productos listos para consumir, estos aspectos han convertido al atún en conserva en una de las fuentes de proteína con mayor demanda por el costarricense, esto tomando en cuenta la publicación realizada por Camacho (2013) donde menciona que nuestro país ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en consumo, estableciendo una ingesta promedio por habitante de 2,5 kg/año.

El consumo moderado de atún en conserva aporta nutrientes a la dieta del ser humano, al ser rico en aminoácidos, vitaminas y minerales, además de considerarse una excelente fuente de ácidos grasos omega 3, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), que ayudan a prevenir y reducir enfermedades cardiovasculares.

La mayoría de los atunes en conserva que ingresan al país provienen, principalmente, de Tailandia, España, China, Filipinas y países de Latinoamérica como Ecuador, México, El Salvador, entre otros. El continente asiático se ha caracterizado por ser una potencia mundial respecto a la cosecha y procesamiento de atún, sus mares poseen componentes como luz, oxígeno, temperatura y profundidad adecuados para la reproducción de una enorme variedad de peces, muchos de ellos utilizados para el comercio.

Sin embargo, situaciones como la experimentación nuclear, la minería y la deforestación han llevado a encontrar niveles altos de mercurio en sus aguas, provocando así mayor concentración del metal en los animales. Se han documentado varios casos en donde existe presencia de mercurio en atún en

conserva, el primero se presentó a mediados del siglo pasado en Minamata, una pequeña ciudad de una isla al sur de Japón.

La primera persona afectada fue una niña de cinco años, que presentó problemas para andar y hablar, así como convulsiones; además de ella, tres personas más resultaron afectadas por la misma situación. Tras varios estudios se comprobó que se trataba de un envenenamiento con metilmercurio debido a la frecuencia de consumo de pescado y mariscos, los casos aumentaron poco tiempo después, fallecieron 17 personas y muchas otras presentaban síntomas similares por lo que pasó a ser un problema de salud pública que alertó a diferentes entes, los cuales realizaron varios estudios y comprobaron que la principal fuente de contaminación provenía de una empresa que se dedicaba a la elaboración de acetaldehído para la síntesis donde se utilizaba el mercurio como catalizador. Dicha empresa eliminaba sus residuos al mar sin un tratamiento previo, lo cual provocó un aumento en la concentración del metilmercurio.

También se ha presentado un caso similar en Perú en el año 2012, cuando una joven de 19 años ingresó al hospital con una sintomatología caracterizada por disnea, dolor torácico, hemoptisis, epistaxis, cefalea y parestesias, de inicio insidioso y curso progresivo. La joven comenta que tres meses atrás "ingirió accidentalmente una taza de café con mercurio" presentó sensación de pesadez y frialdad en su garganta durante y, posterior a la ingesta, dichas molestias ceden espontáneamente a los pocos minutos de haber ingerido la bebida. Gracias a diversos exámenes de sangre y orina se constata que se trata de una contaminación con mercurio elemental.

Además, en Colombia, se han tenido que retirar lotes completos de atún en conserva del supermercado por contener concentraciones más altas de mercurio que las estipuladas por ley, los análisis los realiza el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), que se encarga de realizar actividades de vigilancia y control sobre diferentes alimentos. Cuando un caso es positivo se procede con el retiro del alimento de los supermercados y la emisión de una alerta sanitaria con la que se permite vigilar constantemente dicho alimento.

En el país no se han dado este tipo de casos, no obstante, el MS es el ente encargado de velar por la salud de sus habitantes, a través de programas preventivos que buscan reducir en gran medida el riesgo de contraer diversas enfermedades. Una acción que realiza el MS como parte de sus objetivos preventivos es el análisis microbiológico y químico de alimentos, por medio de laboratorios adscritos a él como el INCIENSA, institución que se encarga de ejecutar los estudios basados en normas, decretos y documentos internacionales o regionales, cuando apliquen.

El INCIENSA se encarga de dar seguimiento en distintas áreas que competen la salud pública, a través, de los diferentes Centros Nacionales de Referencia. En el caso del CNRBRO, este se caracteriza por realizar análisis químicos en distintos alimentos, para ello, se clasifican estos en tres grandes áreas, una es la fortificación de alimentos, caracterizada por la adición de vitaminas y minerales en diferentes presentaciones a los alimentos que se hayan estipulado tras estudios previos. Además, la verificación del cumplimiento en el etiquetado de los alimentos, por medio de la comparación de los resultados obtenidos tras los diferentes análisis y lo declarado en la etiqueta de estos y, por último, la inocuidad química, donde se busca determinar contaminantes en los alimentos, estos no son parte de ellos, pero debido al ambiente donde se desarrollan, pueden adquirirlos. La técnica por validar se clasifica en la categoría de inocuidad química, por lo tanto, cuantificar el mercurio, es una medida que busca asegurar la calidad e inocuidad de las conservas de atún y al mismo tiempo se reduce el riesgo de padecer enfermedades derivadas de la bioacumulación de este metal.

1.2 Descripción de la problemática

De acuerdo con la sección anterior, el INCIENSA es el ente encargado por parte del MS para realizar análisis en alimentos que por decreto deben ser monitoreados, los cuales forman parte de la canasta básica del consumidor, por ello, su vigilancia permite prevenir deficiencias o enfermedades en la población costarricense, principalmente en la más vulnerables como los niños, mujeres embarazadas, adultos mayores y personas con sistemas inmunes débiles.

Actualmente, el CNRBRO del INCIENSA no cuenta con un método para determinar la concentración de mercurio en atún en conserva, por lo tanto, es indispensable que este ente cuente con una metodología confiable para realizar los análisis de control del producto en el mercado de acuerdo con lo estipulado por los entes encargados y así realizar los análisis correspondientes para asegurar una efectiva vigilancia del analito.

1.3 Justificación

En el CNRBRO del INCIENSA, adscrita al MS, se ha detectado la necesidad de determinar la concentración de mercurio en atún en conserva, comercializado a nivel nacional, a pesar que no se han presentado intoxicaciones de mercurio en personas, para el MS es imprescindible conocer la cantidad presente de este metal en el atún en conserva, pues el fin de dicha institución es la prevención de múltiples enfermedades en la población costarricense. Con el objetivo de garantizar esto, se realizan análisis químicos en alimentos con gran demanda en el mercado, ya sea de carácter interno o externo; donde se verifica que los procesos de fortificación y etiquetado se ajustan a lo establecido en los diferentes reglamentos decretados por ley y así resguardar la salud pública de la población en general.

Además, se da seguimiento a posibles contaminantes químicos que pueden encontrarse en los productos alimenticios distribuidos en el país, siendo esta la razón principal para llevar a cabo el desarrollo y la validación del método analítico para determinar mercurio en atún en conserva.

Es de suma importancia para el CNRBRO determinar la cantidad de mercurio presente en este producto, pues la presencia de concentraciones superiores a 1 mg/kg de mercurio en el atún en conserva, representa un riesgo potencial para la salud de la población; por naturaleza, el atún es un depredador por excelencia, captura cualquier tipo de alimento que se encuentre a su alrededor y esto facilita la bioacumulación del metilmercurio en el tejido muscular del pez.

De acuerdo con el Sistema de Gestión de Calidad del INCIENSA, para proceder a realizar la validación del método, se debe tomar en cuenta el procedimiento establecido por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA), ya que cualquier método debe someterse a una validación rigurosa, dado que es un requisito para la realización de análisis químicos. Según Eurolab España (2016), la validación tiene la particularidad de ser un análisis exhaustivo de diferentes parámetros que permite probar que el método utilizado es estadísticamente confiable, y que los errores presentes no brindan diferencias significativas para el propósito establecido.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Desarrollar y validar una metodología para la determinación de mercurio en atún en conserva, mediante la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica por Generación de Hidruros Volátiles, en el CNRBRO del INCIENSA.

1.4.2 Objetivos Específicos

- a. Identificar metodologías utilizadas para la determinación de mercurio en atún en conserva.
- b. Seleccionar la metodología más ajustada a las condiciones actuales del CNRBRO del INCIENSA.
- c. Desarrollar el procedimiento analítico cuantitativo para la determinación de mercurio en atún en conserva, en el laboratorio del CNRBRO del INCIENSA.
- d. Validar el procedimiento analítico cuantitativo para la determinación de mercurio en atún en conserva, en el CNRBRO del INCIENSA.
- e. Determinar la concentración de mercurio en muestras comerciales de atún en conserva, mediante el procedimiento analítico cuantitativo validado.

1.5 Alcance y limitaciones

Alcance

Determinación de la concentración de mercurio en atún en conserva, de diferentes procedencias y distintas presentaciones, a través de la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica por Generación de Hidruros Volátiles, en el CNRBRO del INCIENSA.

Limitaciones

- a. El método se validará para muestras comerciales de atún en conserva en cualquier presentación.
- b. No se pueden analizar todas las marcas y tipos de atún en conserva presentes en el mercado.
- c. Dependencia de las investigadoras sobre el conocimiento en el uso del equipo.
- d. El equipo de Absorción Atómica consta de tres módulos: horno de grafito, llama y generador de hidruros volátiles, este último es el menos utilizado, por ello se desconoce su uso eficaz y eficiente.

1.6 Referente institucional

Reseña histórica

Según consulta realizada en la página del (INCIENSA, 2015), se menciona lo siguiente: en el contexto de una epidemia de cólera a nivel centroamericano que amenazaba extenderse al país, se inició el desarrollo de los Centros Nacionales de Referencia (CNR) en el INCIENSA, con el objetivo de coordinar los laboratorios clínicos del país, a su vez, el proceso de reforma del sector salud vivido en el país, estableció como uno de sus objetivos el fortalecimiento del INCIENSA como una institución nacional para la vigilancia de la salud y el control de calidad.

En dicho contexto, en 1996, el servicio de internamiento del Centro Clínico para la rehabilitación y recuperación de los niños desnutridos se trasladó a los servicios de la seguridad social, manteniéndose en el INCIENSA un programa interdisciplinario de atención ambulatoria a niños con desnutrición.

Referente al marco legal la Ley N° 6088, establece la creación del Inciensa como entidad adscrita al despacho del Ministro de Salud, con la misión de “realizar programas nacionales de investigación y enseñanza en el campo de la salud y la nutrición” (Diario Oficial La Gaceta, 16 de noviembre de 1977). Esta Ley modifica el artículo 1, de la Ley N° 4508, además, en el 2002 la Ley N° 8270 otorga al INCIENSA la personería jurídica instrumental y lo reconoce como responsable de la vigilancia epidemiológica basada en laboratorios, de las investigaciones prioritarias en salud pública y de los procesos de enseñanza en salud (Diario Oficial La Gaceta, 17 de mayo del 2002). Esto último ha permitido al INCIENSA coordinar la red de laboratorios, públicos y privados del país, para la vigilancia de enfermedades de interés para la salud pública.

El Decreto N° 36406-S ajusta la estructura organizativa del INCIENSA a los nuevos requerimientos del ordenamiento jurídico y de la Institución. (Diario Oficial La Gaceta, 15 de febrero del 2011)

Misión

Somos una institución adscrita al Ministerio de Salud que genera y difunde conocimiento e información estratégica para la toma de decisiones en salud pública, mediante la vigilancia epidemiológica basada en laboratorio y especializada, la investigación, la enseñanza, el aseguramiento de la calidad y la verificación del cumplimiento de la normativa en productos de interés sanitario.

Visión

Seremos una institución líder en la generación de conocimiento e información estratégica en salud pública, en apoyo a la rectoría del Ministerio de Salud.

II MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se abordan los conceptos teóricos más importantes asociados al objeto de estudio. En este se explican las características toxicológicas del mercurio, cómo se realiza el procesamiento de atún, cómo es que el mercurio puede llegar a estos alimentos, así como las consecuencias sobre la salud de los consumidores por la presencia de mercurio en atún. Adicionalmente, para comprender lo realizado en esta tesis, se explican las metodologías actuales y modernas para la determinación de mercurio en atún; las metodologías de validación de métodos y finalmente se explica el fundamento de la técnica seleccionada para lograr los objetivos propuestos en este proyecto.

2.1 El Mercurio como Contaminante en los Alimentos

2.1.1 El mercurio: características generales

El mercurio (Hg) es un elemento químico, que se encuentra en la atmósfera, biosfera y geosfera del planeta Tierra en distintas formas, tales como mercurio elemental (siendo este sumamente volátil), mercurio inorgánico y mercurio orgánico. Tomando en cuenta sus características fisicoquímicas, según Jiménez (2009), el mercurio es un metal denso, ya que a 20°C su densidad es de 13,6 g/cm³, su número atómico corresponde a 80 y peso atómico a 200,6 g/mol, además, el mercurio a temperatura y presión ambiente es líquido, de color plateado brillante y sin olor, el punto de fusión es bajo (-38,87°C), y el punto de ebullición (356,6°C) y, por último, Rivera (2001) menciona que el nombre de este metal es tomado del latín *hydrargyrum*, que significa plata líquida.

2.1.2 Especies químicas del mercurio

Autores como (World Health Organization, 2007) mencionan que en la naturaleza el mercurio puede encontrarse en tres estados de oxidación, Hg⁰ (mercurio metálico o elemental), Hg (I) (mercurio mercurioso) y Hg (II) (mercurio mercúrico). Asimismo Torres (2012), lo más común es que este metal forme sales inorgánicas, por ejemplo, el cloruro mercurioso (Hg₂Cl₂), utilizado en la fabricación de medicamentos, nitratos, y el sulfato mercúrico (HgS), usado como pigmento de alto grado para pinturas y compuestos organometálicos. Normalmente, el mercurio está unido a uno o más átomos de carbono, donde las especies más comunes en

el entorno son Hg^0 , $\text{Hg}(\text{II})$, y los compuestos orgánicos como el monometilmercurio (CH_3Hg^+) y el dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), estas formas químicas presentan una alta solubilidad en lípidos y son sumamente tóxicos, cabe mencionar que el (CH_3Hg^+) también es soluble en agua.

2.1.3 Fuentes de exposición del mercurio

- a. Fuentes naturales: este metal se encuentra en la atmósfera, el agua, el suelo, en la corteza terrestre, como resultado de la actividad volcánica o por la erosión de las rocas. Al flujo continuo de este elemento que se produce en la naturaleza, se conoce como ciclo del mercurio.
- b. Liberaciones antropogénicas: presente en la materia prima de los combustibles fósiles como el carbón, gas, petróleo, en minerales extraídos y tratados como la plata y el oro. El vertimiento de mercurio a los ríos es muy común, por consecuencia de la minería ilegal.
- c. Producción industrial: se producen liberaciones cloroalcalinas por la fabricación de papel, instrumentos médicos (termómetros, esfigmomanómetros, bujías y amalgamas dentales), termostatos, lámparas fluorescentes, baterías, faros de automóviles, tratamiento de desechos, vertederos, cremación y como componente en la elaboración de pinturas.

También, Jiménez (2009) expone que, años atrás, en varios países se utilizaba el mercurio como tratamiento fungicida en cultivos para evitar plagas, el dimetilmercurio se empleaba en pequeñas dosis como patrón de referencia en análisis químicos, y el timerosal, compuesto en su mayoría por etilmercurio, el cual se aprovechaba como conservador en vacunas, otros productos médicos y en cosméticos. Para este autor, todas estas fuentes son las responsables de producir CH_3Hg^+ , siendo esta la forma orgánica de mayor presencia en la naturaleza, esto porque los componentes expuestos al medio ambiente experimentan varias transformaciones, un ejemplo de esto es el proceso de metilación, caso muy común en suelos y sedimentos donde las bacterias metanógenas (microorganismos procariotas anaerobias y presentes en el ambiente de forma natural) producidas

por el fitoplancton y las algas, provocan la formación de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, el Hg al ser volátil pasa fácilmente a la atmósfera, océanos y mares.

En otros ambientes, se generan reacciones de etilación donde se forman concentraciones de etilmercurio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), la reducción del Hg^{2+} es la principal fuente de Hg^0 en las aguas saladas superficiales, convirtiendo la reducción del Hg^{2+} en un proceso más significativo. El proceso de reducción se eleva con presencia de luz, en condiciones aerobias y anaerobias, donde se toman en cuenta parámetros químicos del agua, tales como temperatura, pH, aireación, dureza total y conductividad.

2.1.4 Mercurio en agua

Cuando el mercurio se encuentra en medios acuosos, según Cortés (2017) está presente en forma de sales inorgánicas, donde solo una pequeña porción corresponde a metilmercurio, esto debido a las reacciones de metilación en fase acuosa y descomposición de los compuestos orgánicos por la luz solar; asimismo, el Hg en aguas naturales se estima una concentración de mercurio total, que oscila entre 0,2 y 100 ng/l^{-1} , de los cuales en proximidad 0,005 ng/l^{-1} corresponden a metilmercurio, siendo solo un 5% del mercurio total. A pesar de ser un porcentaje considerablemente bajo, este aumenta en zonas acuáticas industrializadas.

Escribá C. (2007) señala que “el mayor problema de contaminación se debe a los desechos industriales, que son arrojados a ríos o lagunas, en ese ambiente los componentes de desecho tienden a lixivarse, es decir, que los líquidos se filtran a través de cualquier material permeable por fenómenos naturales, reaccionando con los productos de descomposición, químicos y otros compuestos, luego estos residuos llegan al mar, y con el paso del tiempo el mercurio se acumula en los peces y todos los seres vivos que habitan en ese lugar”. (p.1)

2.1.5 Toxicidad del mercurio en el cuerpo humano y los alimentos

Al ser el metilmercurio (MeHg) o el (CH₃Hg⁺) la forma más común y la más tóxica del mercurio orgánico, ha sido tema de investigación para conocer las repercusiones que puede ocasionar en la salud, y su capacidad residual. Según lo mencionado por Corredor (2013), esto significa que puede llegar a acumularse en los tejidos u órganos de los seres vivos, considerando que el MeHg en cantidades superiores a 1 mg/kg, provoca efectos negativos en la salud humana.

Se ha establecido según Cortés (2017) que en la gran mayoría de los alimentos, el mercurio se encuentra en forma inorgánica y en concentraciones inferiores a 20 mg/kg⁻¹ de peso fresco y en el caso de los peces y sus derivados, se califican como la principal fuente de metilmercurio en la dieta, reportando niveles mayores a 1200 mg/kg⁻¹ en las porciones comestibles de tiburón, pez espada y atún del mediterráneo. Otra publicación realizada por el Instituto Nacional de Salud de Colombia en el 2015, determina que las especies con mayor bioacumulación de mercurio en las zonas de impacto minero son el bagre, rayado, el blanquillo, la liseta, la mojarra amarilla, el moncholo, la pácora y la doncella, en la misma publicación, Duque, Marrugo, Suárez, & Wills (2015) advierten que “el consumo semanal de estas especies que sobrepase los niveles máximos de mercurio aceptados por la OMS puede producir neurotoxicidad, cardiopatías, enfermedad de Minamata, genotoxicidad, teratogénesis, carcinogénesis, alteraciones en niveles hormonales, células reproductivas y alteraciones cognitivas”.

En la publicación realizada por Cortés (2017), se señala que la OMS ha estimado que los seres humanos pueden llegar a tener un consumo diario de alrededor de 2,4 mg de metilmercurio proveniente de todas las fuentes y una absorción diaria de aproximadamente 2,3 mg. La ingesta diaria total de todas las formas de mercurio se ha estimado en 6,7 mg, con una carga adicional de 3,8 a 21 mg de vapor de mercurio de las amalgamas dentales en los casos en que están presentes. El nivel de mercurio en los peces, incluso para los seres humanos que solo consumen pequeñas cantidades (10-20 g de pescado/día), puede afectar notablemente por la ingesta de metilmercurio. El consumo de 200 g de pescado

que contiene 500 mg/kg-1 de mercurio, se traducirá en la ingesta de 100 mg de mercurio predominantemente metilmercurio.

Conjuntamente, en el mismo estudio elaborado por Cortés (2017), nombra que, desde el punto de vista bioquímico, al consumir alimentos contaminados con compuestos de mercurio, el 95% de metilmercurio presente se absorbe por el tracto gastrointestinal y al exponerse a vapores de este compuesto el 80% se absorbe por inhalación. Por consecuencia, el metilmercurio es transportado por los glóbulos rojos mediante la formación de una asociación de este a una proteína plasmática, de esta manera penetra fácilmente a las membranas y, por lo tanto, se puede distribuir por todo el cuerpo, sin embargo, se ha establecido que la mayor acumulación se da en el sistema nervioso central, en donde permanece en forma orgánica. En otros tejidos como el hígado y el riñón se convierte y almacena como mercurio inorgánico, todo esto favorecido por el hecho de que esta molécula tiene la capacidad de formar un complejo metilmercurio-cisteína que tiene una estructura análoga a la metionina. En las embarazadas, el metilmercurio atraviesa fácilmente la placenta, encontrándose niveles mayores en el cordón umbilical del feto que en la sangre materna.

2.1.6 Procesamiento del atún

De acuerdo con Alimentos Prosalud (2018), en Costa Rica, el proceso del atún en conserva inicia en el puerto de Caldera en Puntarenas, cuando se hace la recepción del producto que se ha comprado a los barcos atuneros de flotillas internacionales. Estos barcos son acompañados por inspectores en sus travesías, de manera que haya una garantía sobre sus métodos de pesca y el respeto de las vedas internacionales.

El atún congelado desde la pesca es transportado en cajas frigoríficas, cuyas instalaciones, como su nombre lo indica, están destinados únicamente al almacenaje con cadena de frío. En las cámaras frigoríficas se realizan las siguientes funciones:

- a. Selección del pescado de acuerdo con el tamaño, especie y calidad.
- b. Control de calidad de la materia prima recibida.

- c. Almacenamiento de la materia prima de tal forma que permita el seguimiento hasta el producto final.
- d. Seguidamente el atún es enviado a la planta de proceso, donde se realiza el descongelado, luego se destaza (cortándolo según las especificaciones de calidad preestablecidas) y se coloca en bandejas que permiten darle continuidad al proceso de trazabilidad.

El siguiente paso es el cocinado, donde las variables de presión y temperatura se encuentran controladas por un sistema automatizado, lo cual garantiza una cocción homogénea de cada uno de los lotes de producción. Posteriormente, personal altamente calificado para garantizar la calidad del producto, procede a realizar la limpieza: etapa en la cual al atún cocido se le quita la piel y los huesos.

Durante el proceso, cada bandeja con lomos es pasada a través de un detector de metales, con lo cual se garantiza la no presencia de materiales metálicos extraños en el producto final. Una vez limpio el atún, pasa a otro departamento, donde, según la presentación que se esté procesando, se agregan los ingredientes de acuerdo con su receta y se esteriliza en las autoclaves. Seguidamente, el producto se envía a las cerradoras, se codifica para establecer el lote de producción y su fecha de vencimiento. Finalmente, las latas se colocan en tarimas que se envían al centro de distribución, desde donde se etiqueta y se despacha según la solicitud de los clientes, quienes se encargan de ponerlo a disposición de los consumidores, tanto en Costa Rica como en el resto del mundo.

2.2 El Mercurio como Contaminante en el Atún

2.2.1 Exposición humana

La presencia del mercurio en los organismos vivos se considera indeseable y potencialmente peligrosa. Jiménez (2009) señala que el 50% de las emisiones de mercurio a la atmósfera se ha generado por actividad volcánica, considerándola una fuente natural, la otra parte se le atribuye a emisiones antropogénicas, dado que la aplicación del mercurio destaca en numerosas actividades humanas, (Rivera, 2001) nombra entre ellas, a la medicina, para el tratamiento de la sífilis (como diurético y catártico), también es usado como catalizador en la producción

de vinilo, en operaciones mineras de refinamiento y extracción, por ejemplo, el oro y la plata, en la elaboración de cemento y acero, en la producción de petróleo, entre otros.

Según Corredor (2013), la exposición a altas dosis de metilmercurio (MeHg) pueden llegar a ser mortales, ejemplo de esto, es el caso ocurrido en Japón entre 1932-1968, donde la empresa productora de fertilizantes, petroquímicos y plásticos Chisso Corporation, al desechar toneladas de mercurio en la Bahía de Minamata, ocasionó un gran impacto al medio ambiente y las especies que habitan esta bahía y superficies marítimas cercanas.

Estudios realizados por la OMS y Regnell & Ewald (1997), sobre el caso en la Bahía de Minamata, revelan que el pescado consumido contenía una concentración promedio de 10 mg/kg de mercurio y fueron reportados más de 2, 200 casos de intoxicación. Gaioli, Amoedo, & González (2012) mencionan que estas personas padecieron varios problemas graves en la salud, en recién nacidos, se dieron trastornos del neurodesarrollo, mejor conocida como “Enfermedad de Minamata”, siendo esta la más significativa, en los adultos, se presentaron otros síntomas neurológicos, tales como: ataxia, temblores, trastornos cognitivos y neurosensoriales.

(IARC, 1993) y (World Health Organization, 2007) han calificado al componente MeHg como un potente cancerígeno para los seres humanos, esto tomando en cuenta la gran tragedia sucedida en Japón y en otras partes del mundo, provocando en las personas efectos negativos.

2.2.2 Situación del mercurio en Costa Rica

(LANASEVE, 2016) menciona que “los contenidos máximos de mercurio establecidos por la normativa nacional e internacional para productos pesqueros es de 1 mg/kg para pescados depredadores y 0,5 mg/Kg para otros productos pesqueros”.

Datos suministrados por el Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC), en Costa Rica, demuestran que, en una década (del 2006-2016), el país importa siete veces más atún, ya que las ventas aumentaron en un 35%, además de acuerdo con los datos facilitados por Promotora de Comercio Exterior (Procomer).

La empresa costarricense, Prosalud, distribuye ocho marcas de atún en nuestra región, que incluyen Sardimar, Tesoro del Mar, Splash y Pacífico Azul, donde estas marcas acaparan el 70% del mercado y otras 30 marcas compiten con esta empresa. Costa Rica se posiciona como cuarto consumidor per cápita de atún en el mundo. (La Nación, 2016)

De todos los peces del mar, el atún es el pez con mayor auge económico a nivel mundial, principalmente en Costa Rica, las especies más comercializadas corresponde al atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), y el atún barrilete (*Katsuwonus pelamis*), ambos viven en aguas oceánicas, regularmente en el Pacífico Oriental, su cuerpo aerodinámico les facilita nadar grandes distancias y a altas velocidades (70 km/h y hasta 110 km/h), a una profundidad aproximada de 100 m, con temperaturas entre 18°C y 31°C, por consiguiente, se localizan en los niveles tróficos más altos de la cadena alimenticia, esto según Olson & Watters, (2003).

Cifuentes, Torres, & Frías (1997) explica que el atún es un depredador por excelencia y es caracterizado por tener una cabeza pronunciada en forma de pirámide, boca pequeña, ojos pequeños y cuerpo alargado, la piel está lubricada con un mucus que reduce la fricción con el agua.

2.3 Tipos de atún

El atún aleta amarilla tiene un peso promedio de 180 kg y cada lomo de atún pesa entre 500 g a 3 kg, se procesa en filetes 100-200 g. (Marviva, 2012). En cambio, el atún barrilete tiene un peso de 15 y 100 kg, con dimensiones de 40 cm hasta 1 m, otras especies de atún pueden llegar a medir entre 3-8 m de longitud y a pesar de 400-900 kg.

Estos peces pasan en movimiento constantemente para no hundirse, ya que su cuerpo es muy pesado, esto por tener músculos muy fuertes y compactos, la vejiga natatoria es muy pequeña, por lo tanto, no les permite mantenerse a flote. Además, al estar en movimiento hace que estos animales presenten un metabolismo sumamente rápido. Sus branquias poseen un sistema eficiente para extraer el oxígeno presente en el agua del mar, adicional a esto, los atunes son excelentes depredadores altamente voraces, excepto en el período de

reproducción (durante los meses de primavera y verano, aunque puede cambiar la época, según la especie). Se alimentan durante todas las estaciones del año, comen de todo lo que encuentran y es tragado sin masticar, a pesar de que la mayoría de las especies tienen dientes. Al momento de ser capturado, según el tamaño del atún pudo haber pasado 5-20 años bioacumulando distintos contaminantes oceánicos, por razonamiento, entre más grande y viejo el pez, mayor concentración de contaminantes. (Cifuentes, Torres, & Frías, 1997)

2.3.1 Comercialización del atún

Existen varias razones para comercializar atún en conserva, principalmente por su abundancia en el Océano Pacífico y, sin duda, es una importante fuente de proteína con un alto valor biológico para los humanos, de acuerdo con (Hurtado, 2017) por cada 100 g contiene un promedio de 23 g de proteína, incluso más que las carnes rojas, aporta 12% de grasa, principalmente omega 3, ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico, DHA y EPA, respectivamente, ideal para cuidar la salud del corazón y las arterias, está compuesto por micronutrientes esenciales, incluyendo vitaminas (A, D y E), minerales como calcio, yodo, fósforo, zinc, hierro, magnesio y selenio, siendo estos muy esenciales para el crecimiento, la reparación y el correcto funcionamiento del organismo en general, esto según lo expuesto por Mozaffrain (2006).

De acuerdo con la Comisión del Codex Alimentarius (2013), el consumo constante de atún en conserva puede representar ciertas dificultades en la salud, dependiendo de la especie, el tamaño del pescado, las prácticas de cultivo o pesca. De ahí nace la preocupación en la salud pública, por investigar específicamente en este tipo de pescado la presencia de contaminantes químicos.

Como menciona Marviva (2012), el Reglamento Técnico para el correcto Etiquetado RTCR 449:2010 indica que el atún aleta amarilla, se debe etiquetar como “atún aleta amarilla”, otras especies como el atún barrilete, atún patudo, atún barrilete fragata, barrilete melvera se etiquetan por su nombre como “atún”. Conjuntamente el atún debe presentar ciertas características, una carne suave, gustosa y que al cocinarla se desmenuce fácilmente. El atún aleta amarilla se

puede distinguir de los demás por la estructura circular de sus lomos, con dirección cóncava hacia la parte dorsal de su cuerpo.

La FAO (2004) menciona los principales puntos de desembarque en Costa Rica, estos se encuentran en litoral pacífico que va de norte a sur, entre ellos están: Cuajiniquil, Playas del Coco, Puntarenas, Quepos y Golfito. Los más importantes se ubican en Barra del Colorado cerca de la frontera de Nicaragua y en Puerto Limón.

El Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (Incopesca), creado en 1994 mediante la Ley de Creación del Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura, (FAO, 2004), menciona que el Incopesca es el ente encargado de la administración de los recursos pesqueros marinos y del desarrollo de la acuicultura, cuenta con personal altamente calificado, incluye biólogos pesqueros, asistentes, estadísticos encargados de interpretar y analizar la información estadística de capturas y características biológicas de las especies y luego tomar decisiones sobre el adecuado manejo de estas poblaciones.

Como se ha mencionado anteriormente, muchos entes se han creado para regular el cultivo, la pesca y el manejo de los productos y subproductos pesqueros en Costa Rica, sin embargo, es necesario complementar dichos procesos, con estudios que permitan respaldar la información obtenida, uno de los métodos más eficientes para obtener datos confiables, es a través de la validación de métodos, esta consiste en una guía para el analista, que le permite trazar las líneas de investigación.

A continuación, se presenta información general respecto a este tema.

2.4 Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado

Actualmente, existen diversos tipos de métodos analíticos para determinar mercurio, las técnicas, los reactivos y los equipos varían entre sí, algunas metodologías que menciona Ruiz (2016) son:

- a. Método colorimétrico de ditizona
- b. Espectrometría de absorción atómica - horno de grafito (GF AAS)
- c. Análisis por activación neutrónica- instrumental (INAA)
- d. Radioquímica (RNAA)
- e. Cromatografía gaseosa - detector de captura electrónica
- f. Detector de emisión atómica
- g. Espectrometría de masas (ICP-MS)
- h. Cromatografía líquida de alta eficiencia - detector de UV
- i. Espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS)
- j. Espectrometría de Fluorescencia Atómica (CVAFS)
- k. Electroquímico
- l. Plasma acoplado inductivamente-espectrometría masas (ID-ICP/MS)
- m. Espectrometría de emisión atómica (ICP/AES)
- n. Espectrometría foto-acústica
- o. Fluorescencia de rayos X
- p. Métodos electroquímicos

2.5 Metodologías para la validación de métodos

2.5.1 Validación

La validación de métodos químicos es de suma importancia para conocer cómo se realiza una técnica analítica ya sea en un laboratorio o en cualquier lugar donde se desee implementar. La validación se resume como la evaluación de errores, con ella se busca conocer que tanto error está presente en el resultado final de un análisis, por lo tanto, asegurar que la magnitud de este no afectará la interpretación del resultado final, y se comprueba que el análisis es aceptable (Westgard, 2008). Además, permite definir al laboratorio un requisito analítico, se

confirma que cuenta con capacidades consistentes y las aplicaciones requeridas para desarrollar la técnica (Eurolab España, 2016). Intrínsecamente, se evalúa el desempeño del método, los analistas, y los equipos. Ante dicha situación es apropiado preguntarse ¿Cuándo se debe validar un método? Cuando se necesite comprobar el desempeño según el uso previsto, dando prioridad a los siguientes casos:

- a. Método no normalizado
- b. Método diseñado/ desarrollado por el laboratorio
- c. Métodos normalizados usados fuera del rango de aplicación
- d. Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados

Es de suma importancia tener en cuenta que una técnica no se puede validar sin antes estar normalizada, lo cual corresponde a: “es una actividad que tiene por objeto establecer, ante problemas reales o potenciales, disposiciones destinadas a usos comunes y repetidos, con el fin de obtener un nivel de ordenamiento óptimo en un contexto dado, que puede ser tecnológico, político o económico” (Organismo Salvadoreño de Normalización, 2017); la normalización busca favorecer una técnica, procedimiento o proceso en diferentes ámbitos relacionados con el progreso técnico, el desarrollo económico y la mejora de la calidad de la vida de los seres humanos.

Durante el desarrollo de la validación, lo más recomendable para llevarla a cabo es utilizar una norma técnica, esta se caracteriza por un contenido aplicable al objeto de estudio, reglas, procedimientos, disposiciones, entregables, entre otros; y con el análisis se establecen características, así como limitaciones del método para el laboratorio, donde el resultado se interpreta como la estandarización del procedimiento, esto se refiere a que el laboratorio toma el procedimiento validado y al replicarlo este debe confirmar su capacidad de trabajo por medio de los resultados obtenidos. A su vez, la normalización es una garantía de que el análisis se realiza en todos los laboratorios que trabajan bajo esta metodología de la misma manera, claro está, con la validación hay variaciones, pero los resultados se pueden comparar y no deben existir diferencias significativas.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la validación es un proceso complejo que busca establecer mediante métodos analíticos características específicas para determinar un analito, para ello, se debe comprobar que el desempeño realizado durante el mismo es el adecuado y que se cumple con el propósito indicado, comparándolo con otro método, conocido como método de referencia World Health Organization (2002) en muchas ocasiones se realizan variaciones en el procedimiento, hablese de equipos, reactivos, analito, condiciones ambientales o similares por las cuales se debe justificar científicamente si tienen incidencia en el resultado final, si existen o no diferencias significativas al hacer una variación en el método de referencia, para esto existen medidas que ayudan a determinar esta situación.

La forma apropiada para validar una técnica consiste en desarrollar el método de referencia seleccionado y documentar detalle a detalle todos los datos obtenidos que sean relevantes para la validación formal; son dos las tácticas primordiales, una es el uso de resultados interlaboratoriales y la otra es la validación del laboratorio individual, el ente que se validará será responsable de asegurar la adecuada aplicación del método referente. Para metodologías basadas en sistemas normalizados, lo ideal es ejecutar análisis entre diversos laboratorios con características similares, los interlaboratorios son herramientas de comparación que le brindan robustez al nuevo estudio.

Conociendo el alcance del proyecto, se pueden definir las características de desempeño de este, sin embargo, estas se pueden ver limitadas durante el desarrollo del procedimiento según se establece en el apartado 5.4.5.3 de la norma ISO/IEC 17025:2005 donde menciona que *la validación es siempre un equilibrio entre costos, riesgos y posibilidades técnicas*, por lo tanto, se debe tomar en cuenta estos puntos durante el desarrollo del método. No obstante, se recomienda una planificación minuciosa de aplicación del desempeño para minimizar riesgos por falta de información pertinente y a la vez contar con un adecuado nivel de confianza en los resultados obtenidos, estos resultados se valoran utilizando diferentes parámetros que se han establecido en guías internacionales como la de la

Eurachem y la del Organismo Argentino de Acreditación (OAA, 2013) o nacionales como el Ente Costarricense de Acreditación. (ECA, 2014)

A continuación, se detalla cada una de las guías mencionadas anteriormente.

2.5.2 Metodologías analíticas consultadas para la validación de métodos de ensayo

2.5.2.1 Guía de validación de la Eurachem

(España, Eurolab, 2016)

Nombre de la guía

La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados.

Autores

Esta guía fue elaborada por los miembros del grupo de trabajo de validación de métodos de Eurachem y otros colaboradores asignados a esta tarea.

Estructura de la guía

La guía cuenta con 10 capítulos y cada uno de ellos consta de diferentes apartados en los cuales se hacen recomendaciones para realizar la validación.

1. Introducción

Este capítulo se hace referencia a la justificación, alcance y notas relevantes de la norma.

2. ¿Qué es validar un método?

Este capítulo hace referencia a las diversas definiciones que se emplean en la norma.

3. ¿Por qué es necesario validar un método?

Este capítulo menciona la importancia de la medición analítica, el desarrollo de métodos y el deber profesional del responsable.

4. ¿Cuándo debe validarse o verificarse un método?

Trata específicamente los temas de validación y verificación, cuando debe emplearse cada uno.

5. ¿Cómo debe validarse un método?

En este capítulo se brinda un paso a paso de cómo se debe realizar una validación, toma en cuenta los responsables, las herramientas, los requisitos, el proceso de validación, además, da recomendaciones de cómo presentar el plan e informe de validación.

6. Características de desempeño de los métodos

En este capítulo se definen los parámetros, aplicaciones y consideraciones a evaluar para realizar una validación, asimismo, la forma de evaluación de cada parámetro.

7. Uso de métodos validados

En este capítulo se realizan recomendaciones para llevar a cabo la validación, se hace mención de las habilidades del analista y de la capacidad instalada.

8. Empleo de los datos de validación para el diseño del programa de control de calidad

En este capítulo se recomienda que durante la validación se lleven controles con los que se pueda comprobar que los resultados obtenidos son confiables.

Estos controles pueden ser internos o externos, dentro de los controles de calidad internos se mencionan: blancos, soluciones patrón, muestras adicionadas, muestras ciegas o incógnitas y para el control de calidad externo se puede participar en Ensayos de Aptitud.

9. Documentación de los métodos validados

Este apartado hace referencia a normas que proporcionan orientación sobre la información a tomar en cuenta a la hora de documentar, resalta la importancia de documentar, así como el uso y control que se le debe dar.

10. Implicaciones de los datos de validación para el cálculo e informe de resultados

En este apartado se menciona el adecuado uso de la información obtenida y el tratamiento de esta misma.

2.5.2.2 Guía de validación del Organismo Argentino de Acreditación

Nombre de la guía

Guía para validación de métodos de ensayo

Código

GUI-LE-03

Autores

Organismo Argentino de Acreditación (OAA, 2013)

Estructura de la guía

La guía cuenta con siete capítulos y cada uno de ellos consta de diferentes apartados en los cuales se hacen recomendaciones para realizar la validación.

1. Objetivo

En este apartado se menciona el objetivo de la guía de validación, con la validación se debe probar la aptitud de los métodos, la capacidad del laboratorio, igualmente, se menciona que los procedimientos y el alcance deben ser determinados por cada laboratorio.

2. Alcance

En este apartado se especifica el alcance de aplicación de la guía en términos de laboratorios, evaluadores y expertos técnicos.

3. Documentación de referencia

Se mencionan normas, documentos, manuales, entre otros que se utilizaron para realizar esta guía.

4. Abreviaturas y definiciones

a. Abreviaturas

Define el concepto de las abreviaturas de diferentes organizaciones y métodos utilizados dentro de la guía.

b. Definiciones

En este apartado se describe detalladamente el concepto de cada uno de los parámetros a evaluar durante la validación, así como otros conceptos relevantes dentro de la guía.

5. Responsabilidades

Se detallan en el capítulo 6 de esta guía.

6. Descripción

En este apartado se indica que el laboratorio debe satisfacer la necesidad del cliente y debe realizar los métodos de acuerdo con la validación, cualquier modificación en la técnica conlleva a una repetición de esta. Algunos de los apartados que lo conforman son los siguientes:

- a. Requisitos generales
- b. Principio de la validación
- c. Especificaciones y alcance de la validación
- d. Informe de la validación

7. Documentación Relacionada

N.A.

2.5.2.3 Guía de validación del Ente Costarricense de Acreditación

Nombre de la guía

Guía para validación de métodos

Código

Código N° : ECA-MC-PO01-G01

Autores

Ente Costarricense de Acreditación (ECA, 2014)

Estructura de la guía

La guía cuenta con seis capítulos y cada uno de ellos consta de diferentes apartados en los cuales se hacen recomendaciones para realizar la validación.

1. Introducción

Se define la importancia de la guía y la aplicación de esta, además, se menciona el aporte de laboratorios, evaluadores y experto técnicos para su creación.

La acreditación bajo esta norma garantiza el reconocimiento de la competencia técnica y los resultados que emiten los laboratorios de ensayo y de calibración.

2. Alcance

En este se establecen las actividades para la validación de métodos de ensayo y calibración, de diferente índole, ya sea desarrollado en el laboratorio,

métodos normalizados o con alguna modificación, con ello se prueba la aptitud de los métodos y la capacidad de los laboratorios.

3. Descripción

En este capítulo se indica que el laboratorio debe confirmar que aplica correctamente el método validado, para ello, deben realizar diversas actividades de validación o de verificación. Algunos de los apartados que lo conforman son los siguientes:

- a. Requisitos generales: son establecidos por el ECA.
 - i. Principios de validación: se definen, los pasos que se debe seguir para validar.
 - 1. Determinar los parámetros de desempeño
 - 2. Establecer los criterios de aceptación
 - 3. Evaluación de los resultados de la validación
 - 4. Declaración de la conformidad del método.
 - ii. Alcance de la validación: aplica de acuerdo al tipo de método y para cada uno de ellos se definen los parámetros que se deben evaluar.
 - 1. Informe de validación: se proporcionan diferentes pautas para elaborarlo.

4. Lineamientos de obtención y evaluación de los parámetros de desempeño

Este capítulo se divide en dos secciones, la primera sección indica que los métodos utilizados por los laboratorios deben estar elaborados por organismo reconocidos, publicados y vigentes.

La segunda sección clasifica los laboratorios de acuerdo con la naturaleza de sus funciones, les sugiere documentos y guías que pueden utilizar para llevar a cabo la validación.

5. Transitorio Identificación de cambios

Se menciona que la política ECA-MC-PO01 política de validación de métodos es de cumplimiento obligatorio para los laboratorios acreditados y en proceso, a partir de seis meses después de su publicación en el diario oficial.

Para el método en estudio, aunado a la anterior y basados en el procedimiento PG-14 Validación o verificación de métodos del INCIENSA, el cual utiliza como base para su desarrollo la guía de validación de métodos del ECA y tomando en cuenta el alcance de la validación (situación normalizado modificado) los parámetros a evaluar son los siguientes:

2.6 Parámetros de validación

2.6.1 Ámbito de trabajo

Se refiere al ámbito entre la menor y mayor concentración del analito en la muestra, incluyendo estas concentraciones, para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión y exactitud.

Modo de evaluarlo

Se realizaron nueve mediciones del estándar de menor concentración y del estándar de mayor concentración. Basándose en la prueba de homogeneidad de varianzas, con el fin de determinar las varianzas entre el estándar de menor concentración y el de mayor concentración, para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^9 (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \text{ (Ecuación 1.)}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^9 y_{i,j}}{n_i} \text{ (Ecuación 2.)}$$

Donde:

i = el número de estándar (5-25) µg/l.

J = el número de repeticiones efectuadas para cada estándar.

\bar{y}_i = promedio de las mediciones del estándar.

y_i = valor de la medición de uno de los estándares.

A partir de las ecuaciones 1 y 2, se determinan las varianzas asociadas al estándar de mayor concentración y menor concentración.

Mediante una relación de la varianza asociada al estándar de mayor concentración con la varianza del estándar de menor concentración se puede determinar si existen diferencias.

$$\frac{S_{10}^2}{S_1^2} \text{ Cuando } S_{10}^2 > S_1^2, \quad \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \text{ Cuando } S_1^2 > S_{10}^2$$

Si la relación es menor o igual al valor tabulado de la distribución f de Snedecor/Fisher para $n-1$ grados de libertad entonces no existen diferencias significativas entre las varianzas y el rango de trabajo está bien ajustado, de lo contrario existen diferencias significativas.

2.6.2 Efecto matriz y Selectividad

Capacidad de un método analítico de cuantificar un analito en presencia de interferencias o la habilidad de un método para determinar específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de prueba.

Modo de evaluarlo

Para la medición de estos parámetros, se realizó un ensayo de recuperación en dos niveles de la curva a definir.

2.6.3 Incertidumbre de medida

Parámetro, no negativo asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al analito. Incluye los errores sistemáticos y aleatorios.

Modo de evaluarlo

Se realizó de acuerdo con el instructivo CNRBRO-IN22 Estimación de la incertidumbre de los resultados en el CNRBRO.

2.6.4 Límite de cuantificación (LOQ)

Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito para la cual la desviación estándar relativa del método (RSD%) es del 10%.

Modo de evaluarlo

Se realizó el análisis de ocho muestras blanco analizadas en condiciones de repetibilidad. Siguiendo los lineamientos descritos en la Guía EuraChem 2016 para muestras blanco con contenido de analitos en concentraciones muy bajas. Se determina el promedio y la desviación estándar (Ecuación 3).

$$LOQ = \bar{X}_{Blanco} + 10 s_{0 (Blanco)} \text{ (Ecuación 3.)}$$

Donde:

\bar{X}_{Blanco} = promedio de las mediciones realizadas al banco

$s_{0 (Blanco)}$ = Desviación estándar de las mediciones realizadas al blanco

$$LOQ = k_Q \times s'_0$$

Como criterio de aceptación el límite de cuantificación no debe ser mayor a 1 mg/kg de mercurio.

2.6.5 Límite de detección (LOD)

Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Se expresa como concentración del analito.

Los valores por encima del LOD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LOD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables. Para realizar la validación del método, es necesario proveer una indicación del nivel al cual la detección se puede complicar.

Modo de evaluarlo

Se realizó el análisis de ocho muestras en blanco, analizadas en condiciones de repetibilidad. Siguiendo los lineamientos descritos en la Guía EuraChem 2016 para muestras blanco con contenido de analitos en concentraciones muy bajas y que se corregirán durante el uso rutinario del método.

Se determina el promedio y la desviación estándar (Ecuación 4.)

$$LOD = \bar{X}_{Blanco} + 3 s_{0 (Blanco)} \text{ (Ecuación 4.)}$$

Donde:

\bar{X}_{Blanco} = promedio de las mediciones realizadas al banco

$s_{0 (Blanco)}$ = Desviación estándar de las mediciones realizadas al blanco

Como criterio de aceptación el límite de cuantificación no debe ser mayor a 1 mg/kg de mercurio.

2.6.6 Linealidad

Capacidad de un método analítico de producir resultados que sean directamente, o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

La relación entre la respuesta del instrumento y la concentración no tiene que ser necesariamente lineal para que el método sea efectivo, pero la curva debe ser repetible de un día a otro.

Modo de evaluarlo

Se analizaron nueve réplicas por cada nivel de concentración para la curva de calibración establecida según el rango de trabajo. Para su evaluación:

Mediante la distribución aleatoria de los residuos, se evaluó si las tendencias sistemáticas son indicativas de no linealidad.

A partir de la homocedasticidad, se determinó si la varianza es constante para todas las concentraciones.

El análisis de varianza de la regresión debe demostrar una desviación no significativa con respecto a la regresión.

Mediante la distribución aleatoria de los residuos se evaluó si las tendencias sistemáticas son indicativas de no linealidad.

El coeficiente de correlación debe encontrarse entre 0,98 y 1,00 y el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor a 0,995.

2.6.7 Repetibilidad

Grado de concordancia entre los datos obtenidos aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, con el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, utilizando el mismo equipamiento, dentro de un mismo laboratorio, es decir, bajo las mismas condiciones.

Modo de evaluarlo

Se analizaron ocho réplicas independientes de la muestra de la ronda interlaboratorial (pescado enlatado), en condiciones de repetibilidad: mismo día, mismo analista y mismo equipo.

Posteriormente, se determinó la desviación estándar (Ecuación 5) y el coeficiente de variación (Ecuación 6) para proceder a realizar la evaluación de este parámetro.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6.})$$

Donde:

s = Desviación estándar relativa

x_i = Valor obtenido para una medición individual

\bar{x} = Promedio de las n mediciones realizadas

n = Número de muestras

$\% CV$ = Porcentaje de coeficiente de variación

Para determinar la validez de los resultados, estos se compararon con el criterio de aceptación que describe Horwitz, según el Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC, tabla A4, se puede tomar como criterio de evaluación para repetitividad, un coeficiente de variación de 11%, para concentraciones aproximadas a 1 mg/kg.

2.6.8 Reproducibilidad

Grado de concordancia entre datos o resultados obtenidos aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, pero cambiando alguna de las siguientes condiciones: laboratorios, operadores, o equipamiento.

Modo de evaluarlo

Se analizaron cuatro réplicas independientes de la muestra ronda interlaboratorial (pescado enlatado), en condiciones de reproducibilidad: diferente día con mismo analista y equipo.

Posteriormente, se determinó la desviación estándar (Ecuación 5) y el coeficiente de variación (Ecuación 6) para proceder a realizar la evaluación de este parámetro.

Para determinar la validez de los resultados estos se compararon con el criterio de aceptación que describe Horwitz, según el Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC, tabla A6, se puede tomar

como criterio de evaluación para reproducibilidad, un coeficiente de variación de 16%, para concentraciones aproximadas a 1 mg/kg.

2.6.9 Recuperación

Se define como la cantidad del analito con el que se haya enriquecido la muestra previa al análisis, para poder evaluar las etapas de extracción de la muestra y el rendimiento del método.

Modo de evaluarlo

Se realizó la preparación de una disolución de mercurio a partir de la Disolución de Hg^{2+} : (1000 ± 4) mg/l preparado 12% HNO_3 m/m; Sigma-Aldrich y se utiliza para el enriquecimiento de distintas muestras en tres niveles de concentración diferentes de mercurio.

La recuperación se calcula de la siguiente manera (ver ecuación 7)

$$R = \frac{C_a - C_b}{C_s}, \text{ (Ecuación 7)}$$

Donde:

R = Recuperación

C_s = es la concentración de analito de la muestra enriquecida

C_b = es la concentración de analito medida en la muestra sin enriquecer

C_a = es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida

Expresada en forma de porcentaje (%):

$$\% R = R \times 100, \text{ (Ecuación 8)}$$

Donde:

R= Recuperación

De acuerdo con el Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC, tabla A5, se puede tomar como criterio de evaluación para recuperación el rango de 80-110%, para concentraciones aproximadas a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Por lo tanto, si el porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango de porcentaje de recuperación reportado en AOAC para el nivel de fortificación realizado, la recuperación es aceptada al utilizar materiales de referencia certificados, comparando con MRC, obtener resultados por un método estándar que sea trazable al SI, mediante el empleo de las muestras de desempeño de los ejercicios de interlaboratorios.

2.6.10 Robustez

Capacidad de un método para mantenerse sin cambios ante pequeñas y a la vez deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. Se puede calcular tomando las siguientes consideraciones:

Identificar las variables que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método, establecer experimentos para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente, se determinarán los efectos de cada cambio sobre las condiciones de medida, de ser posible se diseñaran controles de calidad para las variables críticas.

Modo de evaluarlo

Se evaluó el efecto de modificar algún parámetro dentro del procedimiento de análisis, mediante la realización y medición de cinco curvas de calibración medidas por duplicado, una réplica por cada modificación.

2.6.11 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.

Modo de evaluarlo

Se analizó una muestra de atún escurrido proveniente de la ronda Interlaboratorial.

Como criterio de aceptación, se utilizó el estadístico Z (“zeta score”) que determina el proveedor a partir de la ronda Interlaboratorial.

Todos los factores a evaluar son necesarios para asegurar la confiabilidad del método, pero para poner en práctica cada uno de ellos es necesario contar con un procedimiento analítico, por lo tanto, se realizó una revisión de metodologías con las que se podía determinar mercurio en atún, usando diferentes técnicas, con base en lo descrito anteriormente, se logró elegir la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros Volátiles, a continuación se mencionan aspectos relacionados a dicha técnica.

2.7 Espectrometría de Absorción Atómica

Para conocer un poco los antecedentes de la técnica, es necesario conocer quién es el padre de esta técnica, el principio y algunas de sus características. Se atribuye la creación y desarrollo al científico Inglés Alan Walsh y un equipo de químicos australianos, que tras diversos estudios realizados desde el año 1936 hasta 1952, en este último año se dieron a la tarea de analizar los resultados obtenidos y establecer los parámetros de la misma; no obstante, desde el siglo XIX se habían realizado estudios referentes a esta metodología, estos permitieron tener una base para el desarrollo de la técnica, caracterizada por ser rápida, fácil, precisa y altamente sensible para determinar las concentraciones de más de setenta y cinco de los elementos de la tabla periódica. (Hannaford, 2000)

Los métodos espectrométricos se caracterizan por transformar la muestra en átomos de vapor y leer la emisión electromagnética absorbida o emitida por dichos átomos; haciendo referencia a la absorción atómica, los átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía a una longitud de onda específica, esta se determina en referencia con el analito analizado. Entre mayor sea la cantidad de átomos del elemento mayor será la radiación, esto quiere decir, que la cantidad de energía absorbida es directamente proporcional a la concentración de los átomos del metal analizado, considerando la Ley de Lambert-Beer. Los límites de detección logrados son del orden de ppm (partes por millón).

El principio de la absorción atómica se basa en la atomización, esta consiste en vaporizar las muestras, es decir, hacerlas pasar de un estado fundamental a un estado excitado, con ello, se transforma el mesurando en átomos libres, al vapor obtenido en el proceso se le hace incidir la radiación electromagnética, luego el analito la absorbe y el equipo lee la emisión.

Un elemento con el cual la absorción atómica ha logrado posicionarse a nivel mundial como una técnica confiable es con la determinación de mercurio, ya que este metal se encuentra neutro en fase de vapor a temperatura ambiente, esto significa que una considerable cantidad de átomos en fase de vapor están sobre la superficie del metal líquido, sin necesidad de proveer energía térmica, de esta característica deriva el concepto de “vapor frío” (García, 2010); sin embargo,

después de 1980 este término ha sido remplazado por el de generador de hidruros volátiles. (Fernández, 2018)

Conociendo la concepción de la absorción atómica y basados en las derivaciones que se han hecho al método, surge la espectrometría de absorción atómica de vapor frío (CVAAS), donde en la muestra a analizar se da la reducción del mercurio a mercurio elemental utilizando un agente reductor, por consiguiente, el átomo en estado fundamental puede absorber energía de una radiación a una longitud de onda específica y pasar al estado excitado, de este modo se cuantifica la cantidad de energía en forma de fotones de radiación, absorbida por el analito, debido a que el vapor resultante se traslada a través de un gas inerte, como por ejemplo, el argón, quien lo lleva hasta el espectro definido para su lectura, comúnmente se utiliza en técnicas como absorción, emisión o la fluorescencia. (García, 2010)

Como se mencionó anteriormente, la determinación por esta técnica se realiza adicionando un agente reductor, ya sea cloruro de estaño (SnCl_2) o borohidruro de sodio (NaBH_4) a la muestra digerida, en este caso la reacción del mercurio en solución con el agente reductor produce mercurio atómico que es muy volátil, debido a esto el vapor de mercurio es conducido hacia una celda colocada en el paso del haz de luz, donde ocurre la interacción entre los átomos de mercurio y la radiación, produciéndose la absorción. Indiscutiblemente y a pesar de los avances tecnológicos las técnicas analíticas pueden presentar algunas dificultades para su análisis, entre ellas destacan:

- a. Una digestión incompleta: algún compuesto orgánico no se degrada completamente y puede absorber a las mismas longitudes de onda de algunos metales, causando interferencias espectrales.
- b. Interferencias de matriz: debido a concentraciones altas de sólidos disueltos en el digerido.
- c. Concentraciones altas (mayores a 20 mg/kg): los sulfuros interfieren en la recuperación del mercurio inorgánico y oxida al ion estaño.

- d. Presencia de aniones o similares: como los cloruros que en concentraciones altas causan interferencia, ya que, absorbe a la misma longitud de onda del mercurio.
- e. El material sucio o contaminado: es una de las mayores fuentes de interferencia, por lo cual se debe tener especial cuidado en el lavado, preferiblemente realizar lavados a la cristalería con HNO_3 y agua desionizada para reducir errores en la lectura de las muestras.
- f. Precipitados: debido a altas concentraciones (mayores a 1000 mg/L) de cobalto, cobre, hierro, mercurio, y níquel.

Estos problemas se deben tomar en cuenta antes, durante y después del desarrollo de la técnica para asegurar los resultados del análisis, igualmente importante es cuidar la etapa de preparación de la muestra, de seguida se mencionan aspectos relacionados con esta.

2.7.1 Preparación de la muestra para el análisis de mercurio

Independientemente de la técnica que se utilice para determinar mercurio, es de vital importancia realizar una digestión previa a la muestra, esta puede ser básica o ácida, y consiste en la destrucción total de la muestra, con el fin de lograr la disolución del metal que posteriormente será cuantificado, se entiende que las muestras son solubilizadas y el mercurio es liberado de la matriz biológica o ambiental.

Para dicho análisis, se utiliza la digestión ácida en microondas; es un tratamiento de la muestra con ácidos fuertes, el objetivo principal es eliminar interferencias que puedan obstruir en la lectura del elemento y en el equipo (Jiménez, 2009). Es muy importante recordar que la digestión ácida de la muestra, debe realizarse bajo condiciones controladas debido a la volatilidad de dicho elemento.

III MARCO METODOLÓGICO

3.1 Introducción

El presente trabajo busca desarrollar la validación de una metodología para la determinación de mercurio en atún en conserva en el CNRBRO del INCIENSA y con ello cumplir los objetivos propuestos como desarrollar y validar una metodología para la determinación de mercurio en atún en conserva, mediante la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica por Generación de Hidruros Volátiles, por medio de la identificación de metodologías utilizadas para la determinación de mercurio en atún en conserva, para ello, se debe seleccionar la metodología más ajustada a las condiciones actuales del CNRBRO, así como el desarrollo del procedimiento analítico cuantitativo para la determinación de mercurio en atún en conserva, posteriormente validar el procedimiento analítico cuantitativo para la determinación de mercurio en atún en conserva, en el CNRBRO del INCIENSA y, por último, determinar la concentración de mercurio en diferentes muestras comerciales de atún en conserva, mediante el procedimiento analítico cuantitativo validado.

Este capítulo se compone de los siguientes apartados: tipo de investigación, variables, fuentes de recolección de información, muestra, instrumentos de medición y técnicas, procedimientos y, por último, la hipótesis de trabajo.

3.2 Tipo de investigación

Según Bernal (2010), existen muchos tipos de investigación, cada uno se compone de diferentes características que permiten su uso de acuerdo con la naturaleza de la investigación, basándose propiamente en el objetivo, el problema y la hipótesis de la investigación. Los tipos de investigación que menciona el autor son: investigación histórica, documental, descriptiva, correlacional, explicativa o causal, estudio de caso y experimental.

Asimismo, de acuerdo con el autor, se considera una investigación descriptiva aquella en que, como afirma Salkind (1998), “se reseñan las características o rasgos de la situación o fenómeno objeto de estudio”. Según Cerda (1998), “tradicionalmente se define la palabra describir como el acto de representar, reproducir o figurar a personas, animales o cosas...”; y agrega: “Se deben describir

aquellos aspectos más característicos, distintivos y particulares de estas personas, situaciones o cosas, o sea, aquellas propiedades que las hacen reconocibles a los ojos de los demás”.

Además, para el mencionado autor, una de las funciones principales de la investigación descriptiva es la capacidad para seleccionar las características fundamentales del objeto de estudio y su descripción detallada de las partes, categorías o clases de ese objeto. Este tipo de investigación es muy utilizada e inclusive se conoce como una base en el desarrollo de cualquier investigación, de acuerdo con las características mencionadas anteriormente se clasifica esta investigación como investigación descriptiva.

De la misma forma y según Bernal (2010), esta investigación puede calificarse como una investigación experimental, pues esta se caracteriza por definir o conocer los efectos de los actos producidos por el propio investigador como mecanismo técnico para probar sus hipótesis. Además, para Garita (2016), el propósito de esta investigación es examinar un tema del cual se tienen muchas dudas o nunca se ha abordado antes.

3.3 Variables

Para validar un método analítico, el INCIENSA cuenta con un procedimiento interno en el cual se establecen diferentes variables que permiten cumplir con dicho objetivo, el análisis de cada una de estas variables permite la validación de la técnica.

Las variables que aplican para validar la técnica son:

- a. Veracidad
- b. Repetibilidad
- c. Reproducibilidad
- d. Límite de detección (LOD)
- e. Límite de cuantificación (LOQ)
- f. Ámbito de trabajo
- g. Linealidad
- h. Incertidumbre
- i. Efecto matriz

- j. Recuperación
- k. Selectividad
- l. Especificidad

3.4 Fuentes de recolección de información

La recolección de información es la base de cualquier investigación, las fuentes son tan variadas como la información misma, por ello tener acceso a los datos más confiables es la clave del éxito de la investigación. Según Calderón (2011), se conocen tres tipos generales de fuentes de información: las primarias, las secundarias y las terciarias; las primeras hacen referencia a información obtenida de primera mano, las segundas a información recopilada de publicaciones realizadas por otro autor y las últimas son documentos de consulta que guían al investigador para recopilar más información. Las personas y los artículos científicos son fuente primaria, censos, los sitios web constituyen la segunda fuente de información y, por último, la bibliografía de bibliografías es una fuente terciaria. Del total de fuentes consultadas para realizar esta validación, la mayoría se catalogan como fuentes secundarias, algunas de estas son:

- a. AOAC
- b. OMS
- c. ISO
- d. EURACHEM
- e. ECA
- f. MAG
- g. Periódico El financiero

3.5 Muestra

De acuerdo con López (2004), la muestra se define como aquel sector de la población que se escoge para realizar la investigación, la cual forma parte representativa de la población, adicionalmente al ser este un estudio descriptivo, la muestra a analizar posibilita la predicción probabilística del comportamiento de la población que está investigando.

En esta investigación la determinación de la población, la muestra y el muestreo son definidos y realizados por el MS, ellos se encargan de la recolección y la

entrega de las muestras. El CNRBRO no tiene acceso a los datos explícitos de la elaboración de este apartado.

3.6 Instrumentos de medición y técnicas

3.6.1 Principio

La espectroscopia de absorción atómica es un proceso donde una muestra, se nebuliza, desolvata y atomiza para posteriormente excitarla con una fuente de radiación externa a una longitud de onda específica. La diferencia de la radiación que fue emitida por una fuente externa y la que llega al detector es la que fue absorbida por la muestra, al utilizar la ley de Beer-Lambert se puede conocer la concentración de la muestra a partir de la radiación absorbida.

A continuación, se detallan los equipos, materiales y reactivos para el desarrollo de esta validación analítica en la determinación de mercurio en atún en conserva:

3.6.2 Equipos

- a. Balanza analítica, Marca Mettler Toledo XS 204
- b. Balanza semianalítica Marca AE ADAM, Modelo PGW 753i
- c. Digestor de microondas, Marca BERGHOF-Modelo Speed Wave
- d. Campana de extracción
- e. Congelador/Refrigerador
- f. Computadora
- g. Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Marca Perkin Elmer-Modelo PinAAcle 900T
- h. Generador de hidruros, Marca Perkin Elmer-Modelo FIAS 100

3.6.3 Cristalería y otros

Toda la cristalería deber ser lavada con HNO_3 (1+9) antes de realizar cada análisis. Los beakers, kitsatos o erlenmeyers que se utilizan para portar agua o medir algún reactivo, es recomendable realizarle al menos tres lavados con agua desionizada, antes de su uso, esto para eliminar algún residuo que pueda contaminar o alterar el resultado final. La cristalería para usar en el desarrollo de esta técnica se enlista a continuación:

- a. Balones aforados (10, 50, 100, 200,500) ml
- b. Beakers (10, 30, 100, 250, 500,1000) ml

- c. Erlenmeyers (250,500, 1000,2000) ml
- d. Micropipetas (10-100 y 100-1000) μ l
- e. Pipetas (1, 2, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25) ml
- f. Pipeteador
- g. Plantilla agitadora
- h. Probetas (10, 25, 100, 250, 1000) ml
- i. Selladora
- j. Tamiz #12
- k. Tubos de ensayo 20ml

3.6.4 Reactivos

- a. Agua destilada
- b. Agua desionizada
- c. Cilindro Argón
- d. Compresor de Aire O₂
- e. Ácido clorhídrico (HCl)
- f. Ácido nítrico (HNO₃)
- g. Ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- h. Borohidruro de sodio (NaBH₄)
- i. Hidróxido de sodio (NaOH)
- j. Peróxido de hidrogeno (H₂O₂)
- k. Permanganato de potasio (KMnO₄)
- l. Cloruro de hidroxilamina (HCl:NH₂OH)
- m. Estándar de mercurio (1000 ppm)
- n. Material de referencia

Adicional, se detalla la preparación de reactivos a utilizar en el desarrollo de esta investigación:

Ácido Clorhídrico en fracción de volumen de 3%

Para preparar 1000 ml, tome 30 ml de HCl y deposítelos en un erlenmeyer de 1000 ml, lleve a marca de aforo con agua desionizada.

Solución de dilución (H_2SO_4 en fracción de volumen de 6,5% y HNO_3 en fracción de volumen de 4,0%)

Para preparar 1000 ml, tome 58 ml de HNO_3 (grado metal traza) y 67 ml de H_2SO_4 , deposítelos en un erlenmeyer de 1000 ml, lleve a marca de aforo con agua desionizada.

Permanganato de Potasio en fracción de volumen de 5%

Para preparar 1000 ml de $KMnO_4$, se debe pesar 50 g del reactivo, disolver con agua desionizada utilice una plantilla agitadora para facilitar dicha disolución, por último, llévelo hasta la marca de aforo con agua desionizada.

Solución agente de reducción en fracción de volumen de 0,2%

Para preparar 1000 ml del agente reductor, se debe pesar 0.5 g de NaOH, y 2 g de $NaBH_4$, trasváselos a un erlenmeyer de 1000 ml, con ayuda de una plantilla agitadora disuelva, lleve a marca de aforo con agua desionizada.

Nota: Haciendo uso de equipo de filtración al vacío, filtre esta solución antes de usar.

Cloruro de hidroxilamina en fracción de volumen de 10%

Para preparar 1000 ml HCl: NH_2OH_4 , se debe pesar 100 g del reactivo, con ayuda de una plantilla agitadora disuelva en agua desionizada y lleve a marca de aforo.

3.6.5 Metodología detallada

3.6.5.1 Muestras de atún en conserva

Una vez que las muestras ingresan al Inciensa, se procede de acuerdo con lo descrito en el instructivo CNRBRO-IN06 Recepción, identificación, custodia y descarte de muestras.

Antes de realizar el análisis, las latas se deben lavar, secar y destapar. El contenido se coloca en un tamiz #12, para escurrir el líquido de gobierno (este se debe recoger en un beaker), el atún escurrido se trasvasa al procesador y se procesa,

durante 2 minutos aproximadamente, inmediatamente se deposita en recipientes rotulados con el número de muestra Inciensa.

3.6.5.2 Digestión de la muestra

Se anota en el registro CNRBRO-R75 Hoja de cálculo para la estimación de mercurio en pescado, la información que se solicita.

Se pesa 0,5 g de muestras y controles (Ver Instructivo CNRBRO-IN 11 Operación de la balanza de precisión ADAM) en los tubos de teflón del Digestor de Microondas. A cada tubo se le adiciona, 8 ml de HNO_3 y 2 ml de H_2O_2 , se deja reposar por al menos 15 minutos en la campana de extracción de gases.

Se enciende y programa el Digestor de Microondas de acuerdo con el instructivo CNRBRO-IN51 Operación del Digestor de Microondas.

Trascurrido el tiempo de reposo, a cada tubo se le coloca la tapa de cierre, el disco de ruptura y la copa de acoplamiento.

Se colocan los tubos de teflón en el rotor como indica el equipo, asegurando los tubos a la conexión de acoplamiento, se cierra la tapa del digestor, se conecta el tubo de extracción de aire primario y el tubo de extracción de aire secundario para iniciar la digestión.

Cuando el equipo finalice la digestión, se retiran las mangueras, se sacan los tubos y se llevan a enfriar en un baño de agua con refrigerantes por al menos 15 minutos. Una vez atemperados, se pasan a la campana de extracción, donde se destapan con mucho cuidado para permitir la salida de presión de manera moderada.

Se lava la contratapa de teflón con la solución de dilución, y luego se trasvasa el contenido del tubo cuantitativamente a matraces aforados de 25 ml (esto con ayuda de embudos de plástico y el soporte de madera) se lleva hasta la marca de aforo con la solución de dilución.

De cada muestra se toma una alícuota de 15 ml y se coloca en tubos de ensayo de 20 ml rotulados con los números que indica cada tubo de teflón, se le adicionan 50 μl de KMnO_4 , se tapa cada tubo, se agita despacio y se deja en reposo al menos 2 h, (cada 30 minutos se recomienda agregar 50 μl de KMnO_4 para mantener la oxidación del Hg^{2+} en la muestra).

3.6.6 Preparación de estándares y curva de calibración

a. Solución madre de 100 mg/l.

Se toma 10 ml del estándar de mercurio de 1000 mg/l, se deposita en un matraz aforado de 100 ml, se lleva a marca de aforo con la solución de dilución.

b. Solución Intermedia de 1,00 mg/l

Se toma 1 mL del estándar de mercurio de 100 mg/l, se deposita en un matraz aforado de 100 ml, se lleva a marca de aforo con la solución de dilución.

c. Solución de trabajo de 0,100 mg/l

Se toma 10 ml del estándar de mercurio de 1,00 mg/l, se deposita en un matraz aforado de 100 ml, se lleva a marca de aforo con la solución de dilución.

d. Curva de Calibración

A partir del estándar de 0,1 mg/l de mercurio, se realiza lo siguiente:

Tabla 1 Curva de calibración

Nivel	Concentración($\mu\text{g/l}$)	Alícuota (ml)	Volumen final (ml)
Blanco calibración	0	0	50
Nivel 1	5,0	2,5	50
Nivel 2	10,0	10,0	100
Nivel 3	15,0	7,5	50
Nivel 4	20,0	10	50
Nivel 5	25,0	12,5	50
Blanco reactivos	0	0	50

Nota: Del Nivel 2 se preparan 100 ml para realizar la prueba de sensibilidad al equipo de Absorción Atómica antes de iniciar la lectura, además, para leer como control entre lectura de muestras. Todos los niveles se aforan con solución de dilución.

De cada nivel se toma una alícuota de 15 ml y coloca en los tubos de ensayo rotulados con los números que indica cada tubo de teflón, se adiciona 50 μl de KMnO_4 , se tapa cada tubo, se agita despacio y se deja en reposo (al menos 1 h).

3.6.7 Lectura de la curva de calibración y las muestras

Se procede a encender el equipo de Absorción Atómica de acuerdo con el instructivo CNRBRO-IN50 Uso del Absorción Atómica (Uso del Software WinLab32 para Absorción Atómica).

Para realizar la lectura de la curva de calibración, antes se debe leer el nivel 2 de 10,00 µg/l para corroborar el desempeño de la lámpara de mercurio. Esta sensibilidad debe estar cercana a 0,07 ppm. Si es así se procede a la lectura, de lo contrario, se debe verificar el instructivo CNRBRO-IN50 Uso del Absorción Atómica (Uso del Software WinLab32 para Absorción Atómica) y proceder según lo descrito en este.

Posteriormente, antes de leer los estándares o muestras, adicionar a cada tubo con micropipeta 50 µl de Cloruro de hidroxilamina, agitar manualmente y esperar que el color violeta desaparezca, posteriormente, leer en el Generador de Hidruros Volátiles. Se proceda a realizar la lectura de acuerdo con lo descrito en el instructivo CNRBRO-IN50 Uso del Absorción Atómica (Uso del Software WinLab32 para Absorción Atómica).

El orden para la lectura de las muestras es el siguiente: primero la lectura del Blanco de calibración, después los Estándares de calibración en orden ascendente de concentración, luego las muestras digeridas y, por último, el Blanco de reactivos.

3.7 Recolección de datos

Las muestras de atún en conserva que se analizan en el CNRBRO son recolectadas por el MS.

3.7.1 Procedimiento

El trabajo de investigación se realizó siguiendo diferentes pasos que a continuación se detallan:

3.7.1.1 Búsqueda de información

Se realizó por medio de diferentes buscadores de internet, que permitieron acceder a libros, tesis, artículos y revistas científicas, normas internacionales, además, se consultaron documentos internos del Inciensa.

3.7.1.2 Análisis y selección de información

Se procedió a revisar la información recolectada y se seleccionó aquella que más se adecua al objetivo de investigación y a las condiciones del CNRBRO.

3.7.1.3 Elaboración de la metodología de validación

Una vez seleccionada la información, se procedió a desarrollar la metodología de validación con base en esta, tomando en cuenta las variables descritas en el procedimiento interno del Inciensa y en normas internacionales. Esta metodología cuenta con la propuesta de evaluación de cada una de las variables que aplican para el método normalizado modificado.

3.7.1.4 Desarrollo de la metodología de validación

A partir de la metodología desarrollada en el punto anterior, en el laboratorio se realizaron las pruebas correspondientes para validar cada uno de los parámetros que se establecieron previamente.

3.7.1.5 Análisis de los resultados de la técnica

Los resultados obtenidos de la aplicación del punto 3.7.4 Desarrollo de la metodología de validación, se analizaron de forma detallada e independiente como se propuso en la metodología de validación y con ello comprobar la validez de la técnica seleccionada.

3.7.1.6 Análisis de muestras

Una vez que se validó la metodología seleccionada, se analizaron diferentes muestras recolectadas por el MS en diferentes comercios en nuestro país.

3.8 Hipótesis de trabajo

Para Bernal (2010), una hipótesis es una suposición o solución anticipada al problema objeto de estudio, razón por la cual, es responsabilidad del investigador probar tal suposición, de igual manera es vital, tener en cuenta que, al aceptar una hipótesis como afirmativa, la veracidad de los datos conseguidos solo aporta evidencia a favor del analista.

Del mismo modo para este autor, las hipótesis cumplen ciertas funciones en el desarrollo de una investigación, algunas de las funciones, según Arias Galicia (1991), son:

- a. Se precisan los problemas objeto de la investigación.

- b. Identifican o explicitan las variables objeto de análisis del estudio.
- c. Definen y unifican criterios, métodos, técnicas y procedimientos utilizados en la investigación, con la finalidad de darles uniformidad y constancia en la validación de la información obtenida. Analizando las funciones que cumplen las hipótesis en una investigación, no hay duda acerca del papel importante que estas desempeñan en un estudio y en el campo científico en general.

Y para finalizar, de acuerdo con los objetivos establecidos en el desarrollo de esta investigación, se consideran las siguientes hipótesis de trabajo:

- a. Se han encontrado cantidades de mercurio por encima de la norma de mercurio en atún enlatado comercializado en cadenas de distribución de productos alimenticios costarricenses.
- b. La validación del método de mercurio en atún enlatado permitirá controlar y/o regular la venta/entrada de nuevas marcas comerciales a nuestro país.
- c. El tiempo establecido será el adecuado para concluir la validación y cuantificación de mercurio en atún en conserva.

IV ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Identificación de Metodologías Analíticas

Como se ha mencionado anteriormente, el mercurio es un elemento que está presente de forma natural en la naturaleza, sus efectos son muy tóxicos y pueden afectar especialmente a las poblaciones más vulnerables. Existen muchas vías por las cuales este metal puede entrar en contacto con el ser humano, una de ellas es por medio de la ingesta de productos pesqueros, lo cual ha llevado al desarrollo de muchas técnicas que permiten su determinación. Generalmente, estas técnicas se caracterizan por ser muy selectivas, específicas y sensibles.

A continuación, y basado en la investigación bibliográfica de Ruiz (2016); se presenta un resumen con las diferentes metodologías analíticas usadas para la determinación de mercurio en pescado.

- a. Método Colorimétrico de ditizona: este método se basa en la reacción del mercurio presente en el analito con la ditizona para dar un complejo de ditizonato mercúrico de color naranja, el cual se extrae con cloroformo, en un medio ácido, su intensidad se cuantifica colorimétricamente a una longitud de onda de 490 nm, el límite de detección de Hg total para esta técnica es de 0,01-0,1 mg/g. Dentro de sus desventajas está el uso de grandes volúmenes de reactivos que en ocasiones puede ser difícil conseguirlos, así como los procedimientos de preparación pueden ser complejos. (Piña, Rojas, Lué-Merú, & Torres, 2012)
- b. Método Espectrometría de absorción atómica- horno de grafito (GF AAS): según Mañay, Clavijo, & Díaz (2018), la luz se absorbe por un elemento en estado atómico, a la cual se le mide la atenuación de la intensidad de la luz como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente. El método involucra fundamentalmente dos procesos: la atomización de la muestra y la absorción de radiación proveniente de una fuente por los átomos libres, por lo tanto, este método convierte los elementos presentes en una muestra en átomos o iones elementales en estado gaseoso por medio de un proceso denominado atomización, el límite de detección de

Hg total para esta técnica es de 0,001-1 ng/g. Algunas de sus ventajas son la eliminación de la etapa de pretratamiento térmico, esto ayuda a disminuir la posibilidad de pérdidas de mercurio, además, es muy sensible lo que permite determinar concentraciones en niveles de partes por billón.

- c. Método Cromatografía gaseosa- detector de captura electrónica: es de las técnicas más utilizadas dentro de la cromatografía. Se basa en la separación de las mezclas en fase gaseosa, se inyecta una pequeña muestra a separar en la corriente de un gas inerte a alta temperatura, la corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separa los componentes por medio de un mecanismo de partición o adsorción de la mezcla, el límite de detección de Hg total para esta técnica es de 0,01-0,05 ng/g. Entre sus ventajas se pueden mencionar una gran eficiencia en la separación de los componentes de las mezclas, mayor control de las condiciones cromatográficas que permite obtener resultados más repetibles.
- d. Método espectrometría de masas (ID-ICP/MS): este se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a su masa y su carga, finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado, el límite de detección de Hg total para esta técnica es de 0,1 ng/g, algunas de sus ventajas son la capacidad de medición simultánea de, varios elementos, límites de detección muy bajos, además, permite detectar elementos mayores y traza al mismo tiempo, una de sus desventajas es el efecto matriz.
- e. Método Espectrometría de absorción atómica de vapor frío (CVA AS): es la técnica más utilizada alrededor del mundo, en las muestras líquidas todas las especies de mercurio iónico Hg^{2+} debe ser reducido al estado metálico Hg^0 para las muestras solidas se digieren con ácidos, para pasar todas las especies de mercurio a Hg^{2+} , esta es la única especie capaz de generar vapor de mercurio atómico. El vapor formado se arrastra por un gas inerte hasta una celda de cuarzo donde se da el proceso de absorción,

la longitud de onda es de 253,7 nm en la región ultravioleta, el Límite de detección de Hg total es de 0,5 ng/ml, entre sus ventajas destacan su alta sensibilidad, etapas muy sencillas de extracción y cuantificación satisfactoria del Hg. Dentro de las desventajas están el consumo de tiempo y la posibilidad de pérdida del analito por volatilización. (Chaves, 2016)

- f. Método Espectrometría de fluorescencia atómica (CV AFS): según una investigación realizada por (Chaves, 2016) se ha utilizado para determinar mercurio en algas marinas, esta es una técnica muy sensible con un amplio rango de linealidad permite el uso de instrumentación más sencilla, comparada con las técnicas como espectrometría de masas y absorción atómica. El límite de detección de Hg total es de 0,08 ng/ml.
- g. Método de plasma acoplado inductivamente -espectrometría de masas (ICP MS): es una técnica muy utilizada para la determinación de elementos traza en diversas matrices, han sido muy pocos los casos reportados para determinar Hg^{2+} , se puede mencionar dentro de sus ventajas la alta sensibilidad y su razonable precisión, sin embargo, como desventajas destacan el efecto de memoria que aumenta los recuentos en blanco, empeora el funcionamiento analítico y puede haber pérdidas de mercurio. (Chaves, 2016).

4.2 Descripción de metodologías

En el siguiente cuadro, se resumen las principales variables de los métodos analíticos comentados en la sección anterior, con esto se permite seleccionar la metodología más adecuada

Tabla 2 Resumen de las metodologías para determinar mercurio en alimentos

Nombre del método	Reactivos	Equipos	Fuente
Método Colorimétrico de ditizona	Hidróxido de sodio Oxalato de sodio Ditizona Diclorometano	Espectrofotómetro ultravioleta visible	(Piña, Rojas, Lué-Merú, & Torres, 2012)
Método Espectrometría de absorción atómica-horno de grafito (GFAAS)	Cloruro de Paladio II Ácido ascórbico Tritón X-100 Ácido clorhídrico	Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito	(Mañay, Clavijo, & Díaz, 2018)
Método Cromatografía gaseosa- detector de captura electrónica	Acetona Tolueno Ácido clorhídrico	Cromatografía de gases con detector de captura electrónica	(Vega L. B., Arias, Beltrán, Castro, & Moreno, 2000)
Método espectrometría de masas (ID-ICP/MS)	Ácido fluorhídrico Ácido sulfúrico Acetilacetona Cloroformo	Espectrómetro de masas	(Rodríguez I. P., 2001)
Método Espectrometría de absorción atómica de vapor frío (CVA AS)	Ácido nítrico Ácido sulfúrico Borohidruro de sodio Hidróxido de sodio	Espectrómetro de absorción atómica por generación de hidruros volátiles	

Método Espectrometría de fluorescencia atómica (CV AFS)	Ácido nítrico Ácido clorhídrico Ácido sulfúrico Cloruro de estaño (II)	Espectrometría de fluorescencia atómica con vapor frío	(Lima, 2010)
Método de plasma acoplado inductivamente - espectrometría de masas (ICP MS)	Ácido nítrico Ácido clorhídrico Amoníaco Metilisobutilcetona	Espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo	(Rodríguez I. P., 2001)

4.3 Propuesta de procedimiento analítico

Según (Vinagre, 1997), “se encuentran ciertos criterios importantes para elegir el método a validar, uno de ellos es dar preferencia a métodos cuya calidad y confianza se ha establecido en estudios colaborativos, o similares en varios laboratorios, además preferir métodos documentados o adoptados por organizaciones internacionales reconocidas, y preferir métodos de análisis que se aplican en forma uniforme a varios tipos de alimentos sobre aquellos que se aplican a alimentos específicos”. Asimismo, contar con equipos, materiales, infraestructura y personal adecuado para desarrollar la técnica elegida.

De las siete técnicas identificadas anteriormente para la determinación de atún en conserva, las siguientes metodologías se descartan por varios factores. En el caso del método Colorimétrico de ditizona, el método Cromatografía gaseosa-detector de captura electrónica; el método espectrometría de masas (ID-ICP/MS); el método espectrometría de fluorescencia atómica (CVAFS) y el método de plasma acoplado inductivamente-espectrometría de masas (ICPMS), son técnicas que no se utilizan tanto actualmente, ya que la sensibilidad en otras técnicas es mayor, así como el hecho que el INCIENSA no cuenta con el equipo necesario para las técnicas mencionadas, algunos reactivos no están disponibles en el CNRBRO, y en el caso del método por espectrometría de absorción atómica- horno de grafito (GFAAS) ya está destinado a un análisis en específico, no obstante, se

hicieron algunas lecturas de la curva de mercurio y los resultados no fueron los adecuados.

Dados los factores mencionados anteriormente y los existentes en el laboratorio del CNRBRO, se llega a la conclusión que este posee los equipos idóneos para el desarrollo de la validación, tales como un digestor de microondas, el cual facilita la digestión de las muestras, ya que se reduce el tiempo empleado en esta etapa y se obtienen resultados eficientes pues permite controlar variables como presión, temperatura y tiempo, en comparación con otras técnicas de digestión, el equipo de espectrometría por absorción atómica con generador de hidruros volátiles, caracterizado por una alta sensibilidad y los reactivos a utilizar según el procedimiento están disponibles en el laboratorio, además de un documento oficial de la AOAC que incluye varios métodos analíticos para determinar mercurio en alimentos. Por lo tanto, estos aspectos permiten elegir la metodología por espectrometría de absorción atómica con generador de hidruros volátiles. En resumen, para el procedimiento analítico a validar se tomaron en cuenta:

- a. Instrumentos calificados y calibrados
- b. Lista de materiales y equipo analítico adecuado para la técnica elegida
- c. Métodos documentados: adaptación del método AOAC
- d. Patrones de referencias confiables
- e. Analistas calificados
- f. Integridad de la muestra

4.4 Validación de procedimiento analítico

Para la validación del método, se procedió a analizar los diferentes parámetros que se establecen en el procedimiento INCIENSA PG-14 Validación o verificación de métodos.

4.4.1 Veracidad

Descripción

Se analizó una muestra de atún escurrido proveniente de la ronda interlaboratorial FAPAS 07309 (241) con un total de 14 réplicas. Como criterio de aceptación se utilizó el estadístico Z Score que determinó el proveedor a partir de la ronda interlaboratorial. La condición de evaluación es la siguiente:

Tabla 3 Condición de la evaluación del Z Score

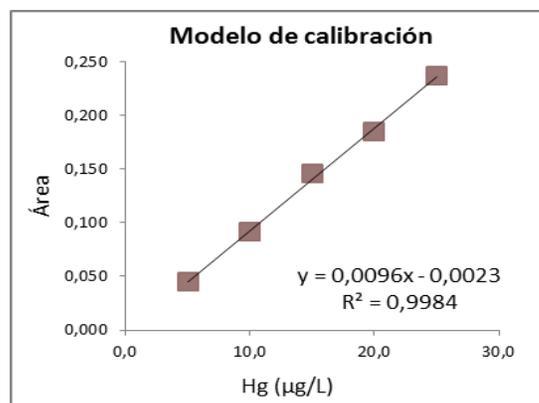
$ Z \leq 2,0$; Satisfactorio, aceptable
$2,0 < Z < 3,0$; Cuestionable, se le asigna (W) como señal de advertencia
$ Z \geq 3,0$; Insatisfactorio, se le asigna (A) como señal de acción

Tratamiento estadístico

Figura 1 Cálculos de áreas para veracidad

Datos	Áreas
1	0,0713
2	0,0696
3	0,0718
4	0,0704
5	0,0712
6	0,0725
7	0,0677
8	0,0714
9	0,0714
10	0,0738
11	0,0669
12	0,0721
13	0,0682
14	0,0698
<hr/>	
PROMEDIO	0,0706
DS	0,0019
%CV	2,756
MAX	0,074
MIN	0,067

Gráfica 1 Modelo de calibración



Gráfica 2 Residuales para veracidad

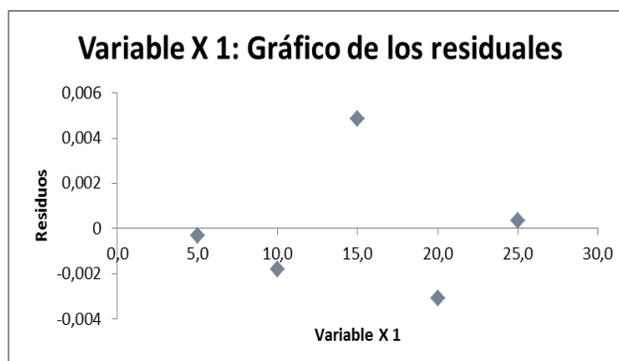


Tabla 4 Resultados de muestras Interlaboratorio FAPAS

laboratory number	analyte					
	Arsenic (total) assigned value: 511 µg/kg		Cadmium assigned value: 7.11 µg/kg		Mercury (total) assigned value: 298 µg/kg	
	result	z-score	result	z-score	result	z-score
031	504	-0.1	<20		334	0.6
032	498.0	-0.1	7.74	0.4	292.0	-0.1
033					344.4	0.8
034	600	1.0	7.8	0.4	300	0.0
035	483.5	-0.3	5.7	-1.2	489.5	3.3
036	506.01	-0.1	20.00		310.50	0.2
037	540	0.3	<20		300	0.0
038					277	-0.4
039					292	-0.1
040			1.56	-3.5		
041	605	1.1				
042	440	0.8	8.12	0.6	299	0.0
043	600.4	1.0	<100.0		289.8	-0.2
044	564.66	0.6	14.44	4.7		
045	646.33	1.5	7.09	0.0	294.62	-0.1

z-scores outside |z| >2 are shown in **bold**, see Section 5

Tabla 5 Resultados de FAPAS

Ronda interlaboratorio	FAPAS 07309
Código de laboratorio	33
Fecha de participación	20/07/2018
El valor obtenido en el interlaboratorio es de 344,4 µg/kg de Hg ²⁺ este encuentra dentro del criterio establecido de aceptación, por lo tanto, se comprueba conformidad para veracidad.	

4.4.2 Repetibilidad (r)

Descripción:

Se analizó un total de ocho réplicas independientes de la muestra FAPAS 07309 (pescado en conserva), en condiciones de repetibilidad: mismo día, mismo analista y mismo equipo.

Posteriormente, se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación para proceder a realizar la evaluación de este parámetro.

Dónde:

s = desviación estándar

x_i = valor obtenido para una medición individual

\bar{x} = promedio de las n mediciones realizadas

n = número de muestra

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Tratamiento estadístico:

Tabla 6 Cálculos para repetibilidad

Muestra: FAPAS 07309

Analista	Fecha	Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	D.S	% RSDr _{experimental}
GBN	18062018	312,96	332,45	24,29	7,31
		305,97			
		319,90			
		326,37			
		318,51			
		351,12			
		346,30			
		378,50			

Figura 2 Ecuación de Horwitz

Ecuación de Horwitz	
% RSDr = $C^{-0,15}$	
% RSDr _{teórico}	13,24

Analito, %	Fracción de Masa (C)	Unidad ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
3,32E-04	3,3E-06	332,45

PRSD _R	13,27
-------------------	-------

Figura 3 Relación de la ecuación de Horwitz y HorRat_r

Relación de HorRat _r	
Horrat _r = (RSD _{r experimental})/RSD _{r teórico})	0,552
0,3 < Horrat _r < 1,3	0,3 < 0,552 < 1,3

Valor obtenido: 0,552

0,3 < 0,552 < 1,3

Criterio de aceptación: 0,3 < HorRat < 1,3

Conclusión: se comprueba conformidad para el parámetro de repetibilidad con respecto al criterio de aceptación.

4.4.3 Reproducibilidad (R)

Descripción:

Se analizó un total de cuatro réplicas independientes de la muestra FAPAS 07309 (pescado enlatado), en condiciones de reproducibilidad: diferente día con mismo analista y equipo.

Posteriormente, se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación (Ecuación 6) para proceder a realizar la evaluación de este parámetro

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Dónde:

s = desviación estándar

x_i = valor obtenido para una medición individual

\bar{x} = promedio de las n mediciones realizadas

n = número de muestras

% CV = porcentaje de coeficiente de variación

Tratamiento estadístico:**Tabla 7 Cálculos para reproducibilidad**Muestra: **FAPAS 07309**

Analista	Fecha	Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	D.S	% RSDr _{experimental}	Varianza
GBN	29052018	395,20	391,69	5,14	1,31	26,40
		386,19				
		396,84				
		388,51				
GBN	30052018	317,71	316,21	11,29	3,57	127,41
		325,80				
		300,02				
		321,31				

Para comprobar que no existan factores distintos a los observados en la prueba de repetibilidad (homogeneidad de varianzas en condiciones de repetibilidad) se realiza un análisis de ANOVA (de un factor). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8 Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de Varianzas		
Réplicas	Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	29052018	30052018
1	320,14	317,71
2	310,59	325,80
3	322,13	300,02
4	313,53	321,31

Tabla 9 Resumen de la prueba de homogeneidad

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 29052018	4	1266,387	316,597	29,550
Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 30052018	4	1264,842	316,210	127,411

Tabla 10 Datos para calcular la reproducibilidad

<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	0,299	1	0,299	0,00380	0,953	5,987
Dentro de los grupos	470,883	6	78,480			
Total	471,181	7				

Tabla 11 Resultados para reproducibilidad

Criterio de aceptación:	$F < F_{crit}$	0,00380 < 5,9873
Conclusión de resultados:	Según la prueba f en cambio de día no afecta la precisión del método	
Observaciones	En la reproducibilidad no intervienen factores distintos a los encontrados en el estudio de repetitibilidad.	

Se procede a realizar la comparación de reproducibilidad:

Tabla 12 Comparación de reproducibilidad

Ecuación de Horwitz		Analito %	Fracción de Masa (C)	Unidad ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
$\% \text{RSDr} = C^{-0,15}$		3,54E-04	3,5E-06	353,95
$\% \text{RSDr}_{teórico}$	13,11	PRSD_R	13,14	

Tabla 13 Promedio general para reproducibilidad

	Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	D.S	$\% \text{RSDr}_{experimental}$
PROMEDIO GENERAL	353,95	41,15	11,63

Tabla 14 Relación con HorRat

Relación de HorRat_r	
HorRat = (RSDR _{experimental})/RSDR _{teórico})	0,887
0,5 < HorRat < 2,0	0,5 < 0,6 < 2,0

Valor obtenido: 0,887

0,5 < 0,887 < 2,0

Criterio de aceptación: 0,5 < HorRat < 2,0

Conclusión: El resultado obtenido para reproducibilidad según el criterio de aceptación es conforme.

4.4.4 Límite de detección (LOD)

Descripción:

Se realizó la medición de ocho muestras blanco (obtenidas a partir del procesamiento de seis tilapias fileteadas, cultivadas en agua dulce), analizadas en condiciones de repetibilidad. Siguiendo los lineamientos descritos en la guía de Eurolab España (2016) para muestras blanco con contenido de analitos en concentraciones muy bajas y que se corregirán durante el uso rutinario del método. Los datos obtenidos se describen a continuación:

Tabla 15 Cálculo para límite de detección

<u>Réplicas</u>	<u>Hg (µg/kg)</u>	<u>Promedio</u>	<u>D.S.</u>
1	47,2		
2	39,7		
3	48,4		
4	42,4	42,3	3,6
5	38,7		
6	40,8		
7	41,3		
8	40,1		

Tratamiento estadístico

El tratamiento de los datos se siguió de acuerdo con el esquema descrito en la guía de (Eurolab España, 2016).

El resultado de s'_0 fue el siguiente:

$$n = 3$$

$$n_b = 2$$

$$s_0 = 3,57$$

s'_0	8,63	$\mu\text{g}/\text{kg}$
--------	------	-------------------------

La estimación del límite de detección se realizó de la siguiente manera:

$$\text{LOD} = 3 \times s'_0.$$

LOD	25,9	$\mu\text{g}/\text{kg}$
-----	------	-------------------------

Valor obtenido: 25,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Criterio de aceptación: $\leq 1.0 \text{ mg}/\text{kg}$ (tomado de RTCR 409:2008 N°34687-MAG, Costa Rica).

Además: $\text{LC} \leq \text{Nivel 1 Curva de Calibración}$

Conclusión: El valor de límite de detección para el contenido de mercurio es aceptable.

4.4.5 Límite de cuantificación (LOQ)

Descripción:

Se realizó la medición la medición de ocho muestras blanco (obtenidas a partir del procesamiento de 6 tilapias fileteadas, cultivadas en agua dulce), analizadas en condiciones de repetibilidad. Siguiendo los lineamientos descritos en la guía de Eurolab España (2016) para muestras blanco con contenido de analitos en concentraciones muy baja.

Tabla 16 Cálculo para límite de cuantificación

Réplicas	Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Promedio	D.S.
1	47,2		
2	39,7		
3	48,4		
4	42,4	42,3	3,6
5	38,7		
6	40,8		
7	41,3		
8	40,1		

Tratamiento estadístico:

El tratamiento de los datos se siguió de acuerdo con el esquema descrito en la guía de Eurolab España (2016).

El resultado de s'_0 fue el siguiente:

$$n = 3$$

$$n_b = 2$$

$$s_0 = 3,57$$

s'_0	8,63	$\mu\text{g}/\text{kg}$
--------	------	-------------------------

La estimación del límite de cuantificación se realizó de la siguiente manera:

$$\text{LOQ} = k_Q \times s'_0.$$

$$k_Q = 10$$

LOQ	86,3	$\mu\text{g}/\text{kg}$
-----	------	-------------------------

Valor obtenido: 86,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Criterio de aceptación: $\leq 1.0 \text{ mg}/\text{kg}$ (tomado de RTCR 409:2008 N°34687-MAG, Costa Rica).

Conclusión: El valor del límite de cuantificación para el contenido de mercurio es aceptable.

4.4.6 Rango**Descripción:**

Para la verificación de conformidad de este parámetro, se realizaron nueve réplicas para los niveles extremos del modelo de calibración propuesto (N1: 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; N5: 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 17 Cálculo para Rango

R	Área	
	STD1	STD 5
	5 µg/L	25 µg/L
1	0,0529	0,2789
2	0,0414	0,2424
3	0,0464	0,2475
4	0,0473	0,2430
5	0,0412	0,2419
6	0,0467	0,2266
7	0,0490	0,2600
8	0,0454	0,2423
9	0,0445	0,2373
Varianzas	S_1^2 1,32E-05	S_1^7 2,23E-04

Tratamiento estadístico:

Se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas para comparar si existen diferencias estadísticamente significativas, las hipótesis propuestas fueron las siguientes:

- H_0 = No existen diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas, por lo que el rango propuesto es adecuado para la calibración (condición $PG < F$).
- H_1 = Existen diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas, por lo que el rango propuesto no es adecuado para la calibración (condición $PG > F$).

Para cada nivel se estimó la varianza (s^2) y el promedio (\bar{y}), a continuación, las fórmulas utilizadas en cada uno:

$$PG = \frac{s_1^2}{s_7^2} \text{ si } s_7^2 < s_1^2$$

El resultado obtenido fue el siguiente:

PG	0,059
F	0,291

Tabla 18 Datos para calcular la hipótesis

	STD 1	STD 5
Media	0,0461	0,2467
Varianza	0,0000	0,0002
Observaciones	9,0000	9,0000
Grados de libertad	8,0000	8,0000
F	0,0593	
P(F<=f) una cola	0,0003	
Valor crítico para F (una cola)	0,2909	

Se acepta la hipótesis nula (H_0) y se descarta la hipótesis alterna (H_1). Por lo tanto, el rango propuesto es adecuado para la preparación de la recta de calibración. El resultado final es el siguiente:

(86,3-1250,0)	ug/kg
(0,0863-1,250)	mg/kg

Valor obtenido: (86,3-1250,0) $\mu\text{g/kg}$

(0,0863-1,250) mg/kg

Criterio de aceptación: El rango de trabajo estará bien ajustado si la diferencia entre las varianzas del primero y último nivel del modelo de calibración es no significativa.

Conclusión: se cumple el criterio de aceptación, se considera satisfactorio el rango elegido, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el estándar de menor concentración (5 $\mu\text{g/kg}$) y el estándar de mayor concentración (25 $\mu\text{g/kg}$).

4.4.7 Linealidad

Descripción:

Se midieron un total de nueve réplicas por cada nivel de concentración para la curva de calibración establecida según el rango de trabajo (la curva de calibración se compone de cinco niveles). Los valores obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 19 Cálculo para linealidad

Nivel	$\mu\text{g/L}$	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	PROMEDIO	DS	Varianza	% C.V.
1	5	0,0529	0,0414	0,0464	0,0473	0,0412	0,0467	0,0490	0,0454	0,0445	0,046	0,003	1,17E-05	7,44
2	10	0,1063	0,0900	0,0967	0,0979	0,0646	0,0943	0,1028	0,0950	0,0918	0,093	0,011	1,26E-04	12,03
3	15	0,1644	0,1354	0,1474	0,1460	0,1423	0,1441	0,1554	0,1429	0,1405	0,146	0,008	6,62E-05	5,56
4	20	0,2207	0,1878	0,1945	0,1939	0,1892	0,1701	0,2113	0,1934	0,1886	0,194	0,014	1,86E-04	7,01
5	25	0,2789	0,2424	0,2475	0,2430	0,2419	0,2266	0,2600	0,2423	0,2373	0,247	0,014	1,98E-04	5,70
	m	0,011	0,010	0,010	0,010	0,011	0,009	0,011	0,010	0,010	0,010			
	b	-0,005	-0,011	-0,004	-0,001	-0,022	0,006	-0,003	-0,004	-0,004	-0,005			
	r	1,000	0,999	1,000	1,000	0,991	0,991	0,982	0,991	0,991	1,000			

Tratamiento estadístico:

A partir de los datos obtenidos, se procedió a estimar el modelo de calibración de mejor ajuste. Utilizando mínimos cuadrados, el resultado fue el siguiente:

Ilustración 5 Modelo de Regresión

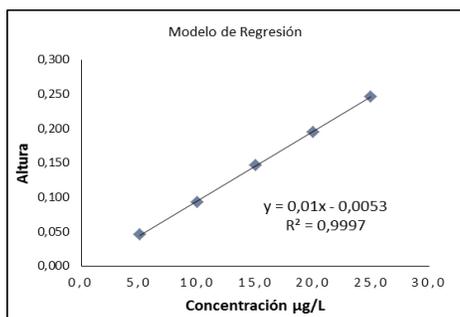
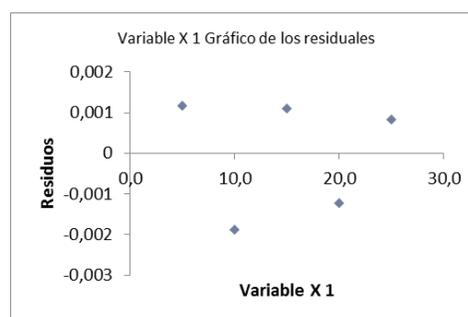


Ilustración 4 Gráfico de los residuales



Se realizó un Análisis de Varianza basado en la descomposición de la suma de cuadrados de residuales y de la regresión, aplicando la siguiente expresión:

$$\sum_i^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_i^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

El estadístico de comparación se da partir de la función de Análisis de datos (regresión) de Excel de la siguiente manera:

Las hipótesis planteadas para el análisis de varianza $F = \frac{\sum_i^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{(n-1) - (n-2)}$ siguientes:

a. H_0 : Hipótesis nula, no existe una asociación de datos.

b. H_1 : Existe una asociación de datos al azar $\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}$

El resultado obtenido fue el siguiente:

Tabla 20 Análisis de varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,02523	0,02523	9119,0618	2,5315E-06
Residuos	3	8,2989E-06	2,7663E-06		
Total	4	0,02523			

Se acepta la hipótesis nula (H_0) y se descarta la hipótesis alterna (H_1), pues se cumple la situación $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$. Por lo que la suma de Cuadrados Residuales es mucho menor que la de regresión y que a su vez es menor que la suma de cuadrados totales, confirmando que la correlación lineal es significativa y no puede atribuirse a la casualidad.

Valor obtenido: 1. $R_2 \geq 0,995$

2. $F_{exp} < F$

Criterio de aceptación: Deberá cumplirse que la suma de cuadrados residuales sea menor que la suma de cuadrados de la regresión y a su vez menor que la suma de cuadrados totales para confirmar que la correlación lineal es significativa y no puede atribuirse a la casualidad.

Por lo tanto

1. $R_2 \geq 0,995$

2. $F_{exp} < F_{crit}$

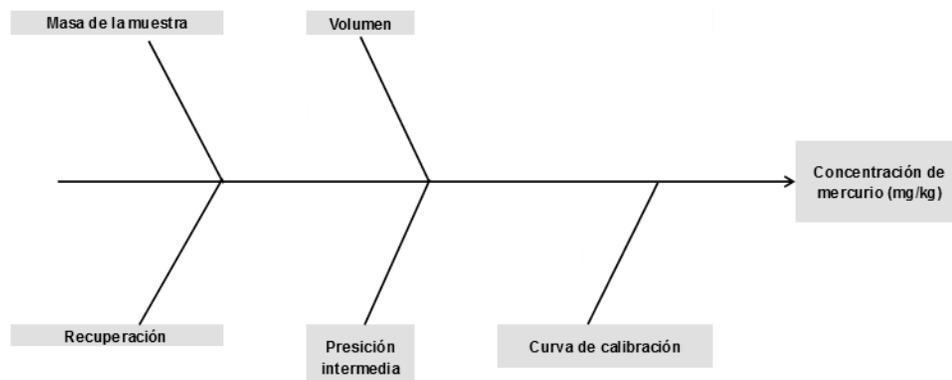
Conclusión: el resultado obtenido para linealidad es conforme.

4.4.8 Incertidumbre

Descripción:

Para caracterizar las fuentes de incertidumbre, se realizó un análisis de Ishikawa, tomando como referencia la definición de mesurando:

Figura 6 Diagrama de Ishikawa



El mesurando se definió de la siguiente manera:

$$\text{Hg}^{2+} (\text{mg/kg}) = \frac{\text{Hg}^{2+} (\text{mg/L}) * \text{vol} (\text{mL}) * (\text{Recup}) * (\text{Repetib})}{\text{masa} (\text{g})}$$

Donde:

Hg²⁺ (mg/L): Contenido de mercurio calculado a partir de la curva de calibración.

Vol (mL): Volumen de dilución utilizado para la preparación de la disolución de lectura.

Masa (g): Masa de muestra (matriz) utilizada en el análisis

(Recup): Consideración de la influencia del factor de recuperación en el mesurando.

(Repetib): Consideración de la influencia del factor de repetibilidad en el mesurando.

Para el tratamiento de los datos y estimación del aporte de cada variable identificada al presupuesto de incertidumbre global se procedió de acuerdo con el método de Monte Carlo, utilizando la herramienta disponible por el NIST en la siguiente dirección: <https://uncertainty.nist.gov/>. Además, se realizó la comprobación mediante el método GUM.

Tratamiento estadístico:

Para la determinación de la influencia de cada variable en la incertidumbre del método, se realizó la estimación del aporte de incertidumbre de cada variable definida en el mesurando siguiendo las siguientes distribuciones:

Tabla 21 Estimación del aporte de incertidumbre

Variable	Distribución asignada	Media	StdDev
Hg ²⁺ (mg/L):	Gausiana	5,97	0,22
Vol (mL)	Rectangular	25,00	0,05
masa (g)	Gausiana	0,500	0,001
(Recup)	Gausiana	1	0,06
(Repetib)	Gausiana	1	0,022

La caracterización de la desviación estándar asociada a cada variable se determinó según la distribución esperada por cada variable. De forma individual, se procedió como sigue a continuación:

Variable: **Hg²⁺ (mg/l)**

Se le atribuye una distribución gaussiana, pues se espera una distribución simétrica alrededor de la media.

Campo de variación:

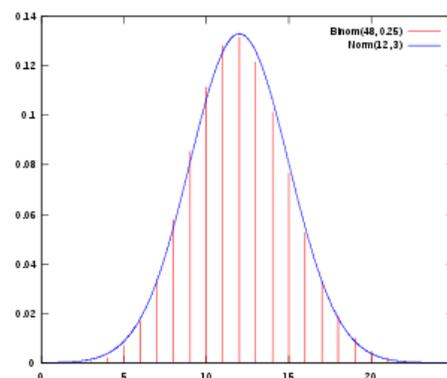
$$-\infty < x < \infty$$

Parámetros:

μ : media, $-\infty < \mu < \infty$

σ : desviación estándar, $\sigma > 0$

Tabla 22 Distribución gaussiana



Variable: **Vol (ml)**

Se le atribuye una distribución triangular dado que se utiliza como valor de incertidumbre la tolerancia reportada por el fabricante, la cual se basa en un rango esperado para el volumen dispensado.

Campo de variación:

$$a \leq x \leq b$$

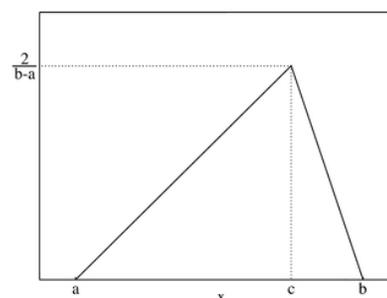
Parámetros:

a : mínimo, $-\infty < a < \infty$

c : moda, $-\infty < c < \infty$ con $a \leq c \leq b$

b : máximo, $-\infty < b < \infty$ con $a < b$

Tabla 23 Distribución triangular



Variable: **Masa (g)**

Se le atribuye una distribución rectangular dado que la estimación correcta de un valor de masa se ubica en un rango con una probabilidad constante (valor de masa obtenido).

Tabla 24 Distribución rectangular

Campo de variación:

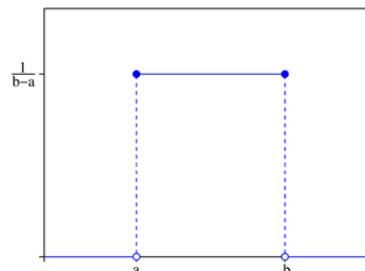
$$a < x < b$$

Parámetros:

a: mínimo, $-\infty < a < \infty$

b: máximo, $-\infty < b < \infty$ con $a < b$

Recuperación: (Recup)



Se le atribuye una distribución gaussiana, pues se espera una distribución simétrica alrededor de la media.

Tabla 25 Distribución gaussiana

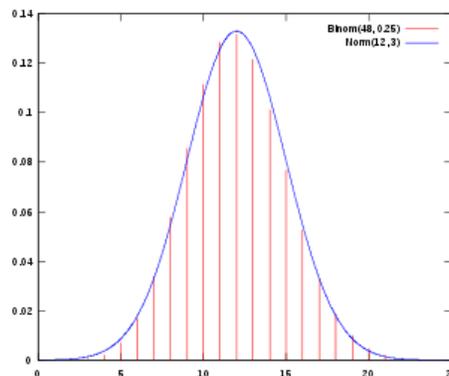
Campo de variación:

$$-\infty < x < \infty$$

Parámetros:

μ : media, $-\infty < \mu < \infty$

σ : desviación estándar, $\sigma > 0$



Repetibilidad: (Repetib)

Se le atribuye una distribución gaussiana, pues se espera una distribución simétrica alrededor de la media.

Campo de variación:

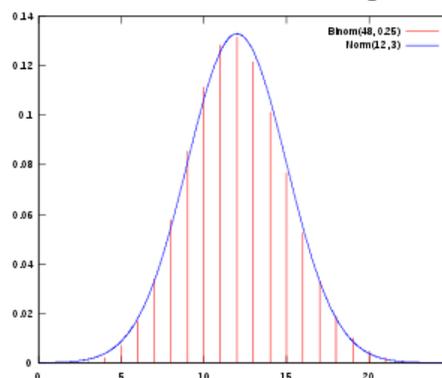
$$-\infty < x < \infty$$

Parámetros:

μ : media, $-\infty < \mu < \infty$

σ : desviación estándar, $\sigma > 0$

Tabla 26 Distribución gaussiana



Los datos de entrada utilizados en la herramienta de cálculo fueron los siguientes:

Tabla 27 Datos para la incertidumbre

NIST Uncertainty Machine

User's manual available [here](#).
[Load examples](#)
 Instructions :

- Select the number of input quantities.
- Change the quantity names if necessary.
- For each input quantity choose its distribution and its parameters.
- Choose the number of realizations.
- Write the definition of the output quantity in a valid R expression.
- Choose and set the correlations if necessary.
- Run the computation.

Drop configuration file here or click to upload

Reset

Random number generator seed:

Number of input quantities:

Names of input quantities:

	x0	x1	x2	x3	x4
x0	Gaussian (Mean, StdDev)		5.97	0.0698	
x1	Gaussian (Mean, StdDev)		25	0.0122	
x2	Gaussian (Mean, StdDev)		0.500	0.001	
x3	Gaussian (Mean, StdDev)		1	0.00124	
x4	Gaussian (Mean, StdDev)		1	0.060	

Number of realizations of the output quantity:

Definition of output quantity (R expression):

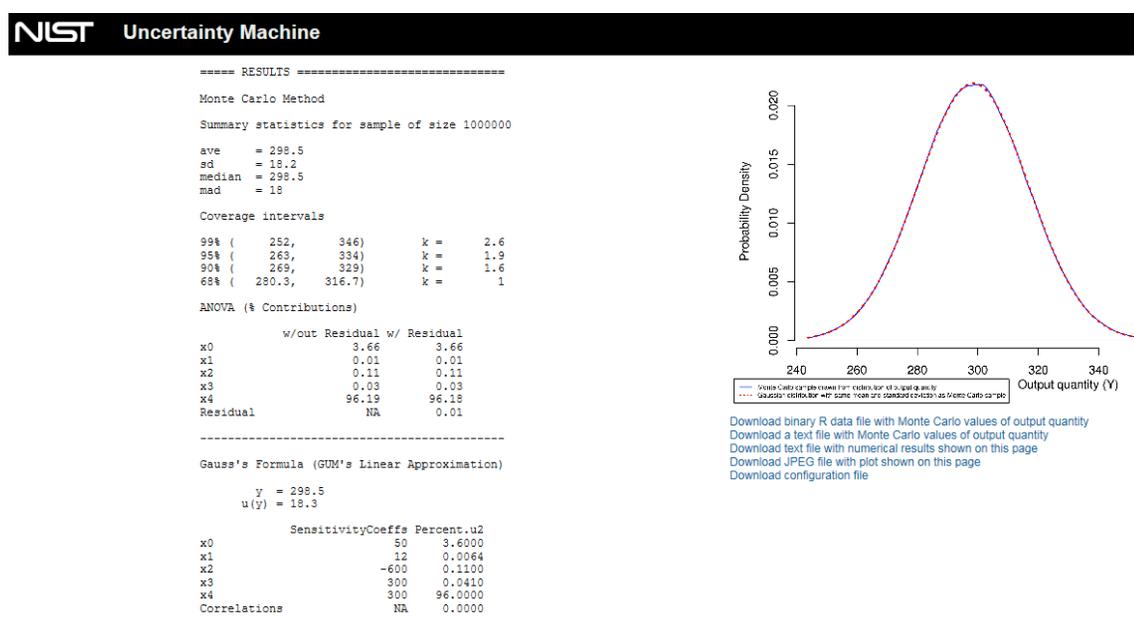
$(x0 * (x1/x2)) * x3 * x4$

Symmetrical coverage intervals
 Correlations

Run the computation

El resultado obtenido fue el siguiente:

Tabla 28 Cálculos para incertidumbre



El resultado obtenido por el método Monte Carlo es el siguiente:

Tabla 29 Resultado por Monte Carlo

y =	298,5	µg/kg
u (y)	18,3	µg/kg
u (y) con k=2	36,5	µg/kg

Por el método GUM se obtiene el siguiente resultado:

Tabla 30 Resultado por GUM

Método GUM

Mesurando:

$$Hg^{2+} (\mu g/kg) = \frac{[Hg^{2+}] \cdot [Vol] \cdot [Recup] \cdot [Repetib]}{[masa]}$$

[Hg²⁺] Contenido de mercurio en la muestra calculado a partir de la curva de calibración (µg/L)

[Vol] Volumen dilución (mL)

[Recup] Recuperación en el punto más crítico (ug/kg)

[Repetib] Repetibilidad del método (ug/kg)

[masa] Masa de muestra utilizada (g)

Componente	Valor x_i	Fuente de información	Incertidumbre	Distribución probabilidad	Incertidumbre típica $u(x_i)$	Derivada parcial (δ)	Coefficiente de sensibilidad c_i	Contribución $c_i \cdot u(x_i)$	Contribución $[c_i \cdot u(x_i)]^2$	Contribución porcentual (%)
Hg ²⁺ (µg/L)	5,97	Mediciones repetidas	0,22	Normal	0,0696	$Hg^{2+} \left(\frac{\mu g}{kg}\right) = \frac{[vol] \cdot [Recup] \cdot [Repetib]}{[masa]}$	50,0	3,48	12,10	3,63%
Vol (mL)	25,00	Tolerancia	0,03	Triangular	0,0122	$Hg^{2+} \left(\frac{\mu g}{kg}\right) = \frac{[Hg^{2+}] \cdot [Recup] \cdot [Repetib]}{[masa]}$	11,9	0,15	0,02	0,01%
Masa (g)	0,500	Mediciones repetidas	0,002	Rectangular	0,001	$Hg^{2+} \left(\frac{\mu g}{kg}\right) = -\frac{[Hg^{2+}] \cdot [Recup] \cdot [vol] \cdot [Repetib]}{[Masa]^2}$	-597	-0,69	0,48	0,14%
(Recup)	1	Mediciones repetidas	0,013	Normal	0,00124	$Hg^{2+} \left(\frac{\mu g}{kg}\right) = \frac{[Hg^{2+}] \cdot [vol] \cdot [Repetib]}{[masa]}$	298,5	0,37	0,14	0,04%
(Repetib)	1	Mediciones repetidas	0,060	Normal	0,060	$Hg^{2+} \left(\frac{\mu g}{kg}\right) = \frac{[Hg^{2+}] \cdot [vol] \cdot [Recup]}{[masa]}$	298,5	17,91	320,77	96,18%
								$u^2 (\mu g/kg)$	333,5	
								$u (\mu g/kg)$	18,3	36,5

El resultado obtenido por el método GUM es el siguiente

Tabla 31 Resultado por GUM

y =	298,5	µg/kg
u (y)	18,3	µg/kg
u (y) con k=2	36,5	µg/kg

El resultado final se expresaría de la siguiente manera:

“El resultado promedio del ensayo es (298,5 ± 36,5) (µg/kg)”. El número que sigue al símbolo “±” corresponde a la incertidumbre expandida (U = u (y)*k), con un factor de cobertura (k=2) basado en una distribución de probabilidad normal, para un nivel de confianza de 95%.

“El resultado promedio del ensayo es 298,5 µg/kg ± 12.2 %”. El número que sigue al símbolo “±” corresponde a la incertidumbre expandida ($U = u(y) \cdot k$), con un factor de cobertura ($k=2$) basado en una distribución de probabilidad normal, para un nivel de confianza de 95%

Valor obtenido: U= 36,5 µg/kg, U= 12,2 %

k = 2; 95 % Nivel de confianza

Criterio de aceptación: (16-22) % para (100 ppb-1.0 ppm) (Codex, Apéndice F)

Conclusión:

La incertidumbre obtenida es menor al criterio de aceptación propuesto. Se usó un criterio de comparación secundario declarado en el artículo: (Damin, Santo, Hennigen, & Vargas, 2013)

El valor dado en dicha publicación es 13,7%. Por lo tanto, valor obtenido se encuentra por debajo de la referencia consultada.

4.4.9 Efecto matriz y Selectividad

Descripción:

Para la medición de estos parámetros, se realizó un ensayo de recuperación en dos niveles: 5,0 µg/l y 20,0 µg/l. Con el fin de realizar una comparación directa con los niveles 1 y 4 del rango de trabajo evaluado. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 32 Cálculos para Efecto matriz y selectividad

5,0 µg/L			20,0 µg/L		
Altura (abs)			Altura (abs)		
Réplicas	Hg ²⁺	Hg ²⁺	Réplicas	Hg ²⁺	Hg ²⁺
(Nivel bajo)	(Matriz)	(Disolución)	(Nivel Alto)	(Matriz)	(Disolución)
1	0,040	0,041	1	0,220	0,242
2	0,043	0,046	2	0,225	0,248
3	0,046	0,047	3	0,229	0,243
4	0,040	0,041	4	0,223	0,242
5	0,042	0,047	5	0,223	0,227
6	0,046	0,049	6	0,220	0,260
7	0,041	0,045	7	0,227	0,242
8	0,042	0,045	8	0,235	0,237

* Las muestras fueron analizadas en condiciones de repetibilidad (mismos días, mismo analista).

Tratamiento estadístico:

Primero se realizó una estimación del aporte de varianzas en cada nivel, para descartar un efecto acumulativo y confirmar la homocedasticidad en los niveles evaluados. El resultado fue el siguiente:

Tabla 33 Resultados para Efecto matriz y Selectividad

Descriptores	Hg ²⁺	Hg ²⁺	Descriptores	Hg ²⁺	Hg ²⁺
	(Matriz)	(Disolución)		(Matriz)	(Disolución)
Media (Nivel 1)	0,0423	0,0452	Media (Nivel 2)	0,225	0,243
Varianza	6,33E-06	7,64E-06	Varianza	2,6E-05	8,7E-05
Observaciones	8	8	Observaciones	8	8
Grados de libertad	7	7	Grados de libertad	7	7
F	0,8276		F	0,2933	
P(F<=f) una cola	0,4046		P(F<=f) una cola	0,0640	
Valor crítico para F (una cola)	0,2641		Valor crítico para F (una cola)	0,2641	

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

- a. H_0 : No existen diferencias en las varianzas evaluadas
- b. H_1 : Existen diferencias en las varianzas evaluadas

El criterio de comparación fue el siguiente:

$$F > F_{\text{crit}}$$

Para ambos niveles evaluados, se descarta la hipótesis nula y se acepta la alternativa: **no existen diferencias en las varianzas evaluadas.**

Con el fin de determinar el efecto de la matriz y la selectividad se realizó un ensayo de una muestra matriz (músculo de tilapia) enriquecida y se comparó con una muestra blanco en los mismos niveles de concentración, el resultado fue el siguiente:

Tabla 34 Comparación entre tilapia enriquecida y una muestra blanco

<i>Descriptores</i>	Hg^{2+}	Hg^{2+}
	<i>(Matriz)</i>	<i>(Disolución)</i>
Media	0,0423	0,0452
Varianza	6,33E-06	7,64268E-06
Observaciones	8	8
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	-2,2065	
P(T<=t) una cola	0,0223	
Valor crítico de t (una cola)	1,7613	
P(T<=t) dos colas	0,0445	
Valor crítico de t (dos colas)	2,1448	

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

- a. H_0 : No existen diferencias en las muestras evaluadas.
- b. H_1 : Existen diferencias en las muestras evaluadas.

Valor obtenido: $F < F_{\text{crit}}$

Criterio de aceptación:

Los resultados obtenidos deben estar libres de interferencias matriciales o espectrales.

Evaluación de blancos de matriz y muestras o estándares para verificar que la respuesta sea única al analito.

Conclusión:

$$F < F_{\text{crit}}$$

No existen diferencias significativas entre los valores obtenidos de las soluciones estándar y las muestras en blanco enriquecidas.

Esta observación confirma que no hay una matriz que interfiera y que la digestión de microondas podría proporcionar una digestión completa de las muestras investigadas.

Este resultado es satisfactorio con respecto a los criterios de aceptación establecidos en la Decisión de la Comisión 333/2007, según el artículo de la (Comisión Europea, 2007), donde la especificidad debe estar libre de interferencias matriciales o espectrales.

Sobre la base de estos resultados para la validación y el análisis de rutina, se utilizaron curvas de calibración en solución.

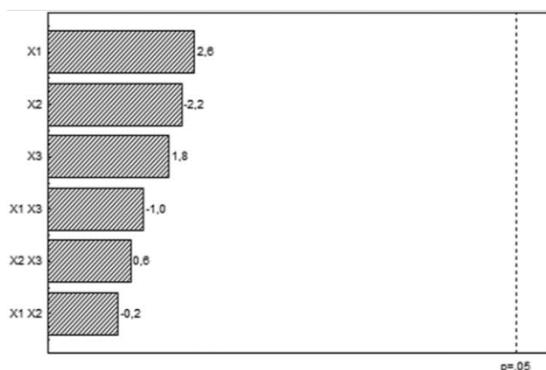
4.4.10 Robustez

Descripción:

Para la medición de este parámetro, se evaluó el efecto de modificar la concentración del agente reductor (NaBH_4) sobre la sensibilidad instrumental (absorbancia reportada para una disolución de $10 \mu\text{g/l}$) mediante la realización y medición de cinco curvas de calibración medidas por duplicado, una réplica por cada modificación.

No se evaluó el efecto de los parámetros relacionados con la masa de muestra y la mezcla de digestión (volumen de HNO_3 y H_2O_2) pues según las referencias: Damin, Santo, Hennigen, & Vargas (2013) y Nascimento, y otros (2012), el efecto de estas variables sobre el desempeño del método es despreciable. Como se demuestra a continuación:

Gráfica 3 Efecto del cambio de variables



Siendo X1: Masa de muestra (g), X2: Volumen de ácido (ml), X3: Volumen de peróxido (ml).

Tratamiento estadístico:

Los resultados de la evaluación de Robustez se muestran a continuación:

Tabla 35 Resultados para Robustez

Curvas	Variable	NIVELES ($\mu\text{g/L}$)					Sensibilidad (10 $\mu\text{g/L}$)
		5,0	10,0	150,0	20,0	25,0	
1	Tratamiento 1	0,049	0,099	0,146	0,199	0,253	0,0801
1	Tratamiento 2	0,016	0,062	0,142	0,151	0,202	0,0907
2	Tratamiento1	0,048	0,074	0,099	0,177	0,223	0,0996
2	Tratamiento2	0,045	0,089	0,145	0,184	0,226	0,0889
3	Tratamiento1	0,047	0,094	0,139	0,186	0,231	0,0956
3	Tratamiento2	0,044	0,093	0,139	0,181	0,223	0,0904
4	Tratamiento1	0,050	0,102	0,153	0,203	0,256	0,1049
4	Tratamiento2	0,045	0,091	0,139	0,179	0,223	0,0790
5	Tratamiento1	0,047	0,099	0,15	0,203	0,257	0,0959
5	Tratamiento2	0,048	0,097	0,143	0,2	0,247	0,0953

Donde:

Trat 1	NaOH 0,05 %; NaBH4 0,2 %
Trat 2	NaOH 0,005 %; NaBH4 0,02 %

Primero, se realizó un análisis de ANOVA para determinar la naturaleza del aporte de las varianzas para cada tratamiento y descartar un efecto acumulativo y confirmar la homocedasticidad.

Tabla 36 Prueba F para varianzas

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Tratamiento1	Tratamiento2
Media	0,009814	0,0092252
Varianza	4,18E-07	2,26E-07
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	1,848	
P(F<=f) una cola	0,283	
Valor crítico para F (una cola)	6,388	

Hipótesis	Conclusion
F<Fcrit	Varianzas iguales

El criterio de comparación fue el siguiente:

$$F \leq F_{\text{crit}}$$

Para ambos tratamientos se descarta la hipótesis nula y se acepta la alternativa: **no existen diferencias en las varianzas evaluadas.**

Seguidamente, se realizó un análisis de ANOVA (de un factor), comparando la recuperación entre una muestra fortificada en matriz y otra fortificada en una disolución de reactivos únicamente:

Tabla 37 Resumen de las variables

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Trat 1	5	4,91E-02	9,81E-03	4,18E-07
Trat 2	5	4,61E-02	9,23E-03	2,26E-07

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	8,67E-07	1	8,7E-07	2,692	0,140	5,318
Dentro de los grupos	2,58E-06	8	3,2E-07			
Total	3,44E-06	9				

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0	No Si existe afectación en la variable observada	$F < F_{\text{crit}}$
H_1	No hay afectación en las variables observadas	$F > F_{\text{crit}}$

El resultado obtenido de F_{crit} confirma la hipótesis nula y descarta la hipótesis alterna: no existe afectación en la variable observada.

Valor obtenido: $F < F_{\text{crit}}$

Criterio de aceptación: $F < F_{\text{crit}}$ (ANOVA de un factor)

No existe afectación en la variable observada.

A modo de resumen a continuación, se presenta una tabla con los datos obtenidos para cada parámetro posterior al proceso de validación.

Tabla 38 Resultados obtenidos para cada parámetro de validación

Parámetro de validación	Resultado Obtenido	Criterio de aceptación
Efecto matriz/Selectividad	$F < F_{crit}$. No existen diferencias significativas entre los valores obtenidos de las soluciones estándar y las muestras en blanco enriquecidas	$F < F_{crit}$ 1. Los resultados obtenidos deben estar libres de interferencias matriciales o espectrales. 2. Evaluación de blancos de matriz y muestras o estándares para verificar que la respuesta sea única al analito.
Incertidumbre	36,5 µg/kg U=12,2%	(16 - 22) % para (100 ppb-1.0 ppm) (Codex, Apéndice F)
Linealidad	Deberá cumplirse que la suma de cuadrados residuales sea menor que la suma de cuadrados de la regresión y a su vez menor que la suma de cuadrados totales para confirmar que la correlación lineal es significativa y no puede atribuirse a la casualidad. Por lo tanto 1. $R_2 \geq 0,995$ 2. $F_{exp} < F_{crit}$	1. $R_2 \geq 0,995$ 2. $F > F_{crit}$ (Análisis de varianza) La correlación lineal debe ser significativa
Límite de cuantificación	86,3 µg/kg	≤ 1.0 mg/kg (tomado de RTCR 4069:2008 34687-MAG, Costa Rica)
Límite de detección	25,9 µg/kg	≤ 1.0 mg/kg (tomado de RTCR 4069:2008 34687-MAG, Costa Rica)
Rango	Se cumple el criterio de aceptación, se considera	No deben existir diferencias

	<p>satisfactorio el rango elegido</p> <p>Por lo tanto, el rango propuesto es adecuado para la preparación de la recta de calibración</p> <p>86,3 -1,250 µg/kg</p>	<p>estadísticamente significativas entre las varianzas del nivel 1 (5 µg/L) y el nivel de mayor concentración (25 µg/L)</p>
Repetibilidad	0,552	0,3 < HorRat < 1,3 (AOAC)
Reproducibilidad	0,887	0,5 < HorRat < 2,0 (AOAC)
Robustez	<p>El resultado obtenido de F_{crit} confirma la hipótesis nula y descarta la hipótesis alterna: no existe afectación en la variable observada.</p>	<p>$F < F_{crit}$ (ANOVA de un factor)</p> <p>No existe afectación en la variable observada</p>
Veracidad	344,4 µg/kg $ z $ 0,8	$-2,0 \leq z \leq 2,0$

Se concluye que todos los parámetros analizados son conformes para la validación.

4.5 Muestras en el mercado

El MS como órgano encargado de vigilar la salud pública, realizó la recolección de muestras de alimentos en supermercados para el posterior análisis en el INCIENSA.

Para la presente validación, se realizó el análisis de 30 muestras de atún enlatado recolectado en comercios costarricenses, las marcas de dichas muestras varían respecto a tipo de atún, presentación, productor y país de origen, con el fin de resguardar los datos sensibles de cada una de las muestras se ha designado un código aleatorio a cada muestra, como se aprecia a continuación:

Tabla 39 Identificación de las muestras

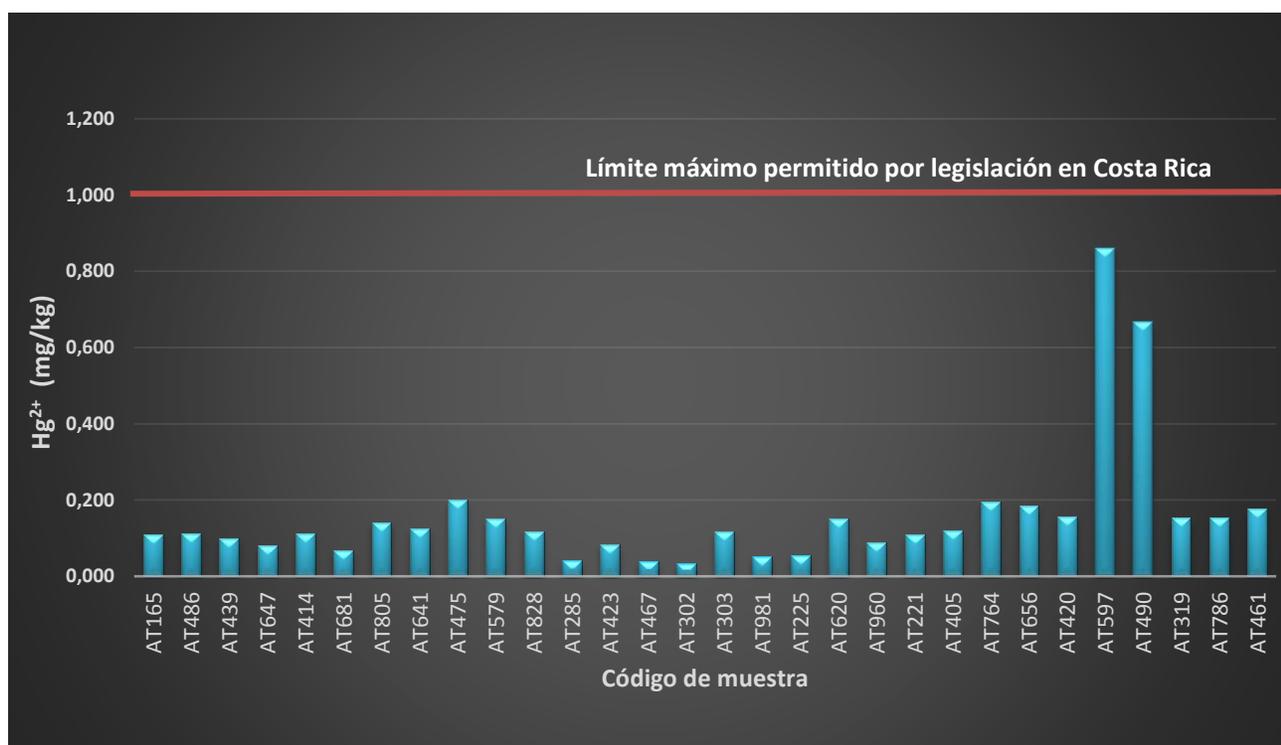
Número de muestra	Código	Número de muestra	Código
1	AT165	16	AT302
2	AT486	17	AT764
3	AT439	18	AT960
4	AT647	19	AT656
5	AT414	20	AT221
6	AT681	21	AT420
7	AT805	22	AT597
8	AT641	23	AT405
9	AT620	24	AT303
10	AT475	25	AT490
11	AT579	26	AT319
12	AT828	27	AT786
13	AT285	28	AT981
14	AT423	29	AT225
15	AT467	30	AT461

Una vez que se asignó un código a cada muestra, se procedió a analizar cada una de ellas, de acuerdo con el método AOAC 971. 21 Determinación de mercurio en alimentos, realizando las modificaciones pertinentes. Cada muestra se

identificó, procesó y empacó de manera individual, posteriormente, se realizó el análisis, los cálculos correspondientes y se tabularon los datos obtenidos.

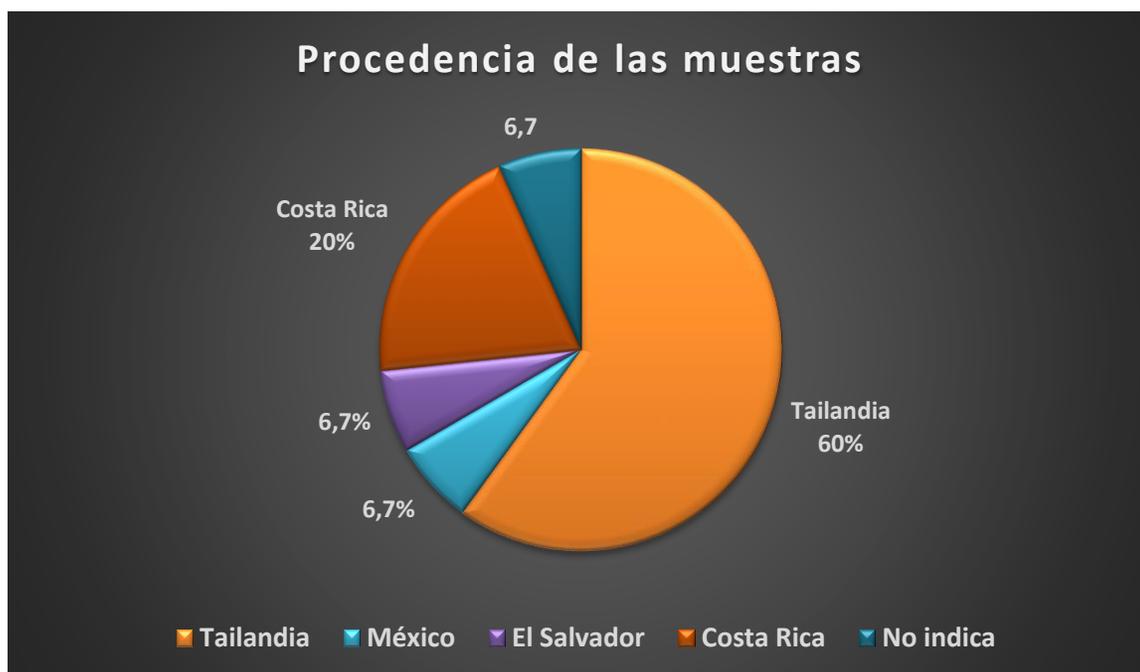
Como se aprecia en la gráfica 4, el 100% de las muestras analizadas se encuentra por debajo del límite máximo permitido de Hg^{2+} en alimentos, por lo tanto, el resultado obtenido es conforme, se dio una tendencia de resultados por debajo de los 0,3 mg/kg, pues el 93% de las muestras analizadas se clasifica dentro de este rango, únicamente el 7% de las muestras tuvo valores arriba de 0,5 mg/kg, estas muestras provienen del mercado costarricense.

Gráfica 4 Resultados de las muestras analizadas



En cuanto a la procedencia de las muestras, esta varía entre países mundialmente conocidos por la producción de atún en conserva como Tailandia, México y otros como El Salvador y Costa Rica. De Tailandia proviene el 60% de los atunes analizados, seguidamente, Costa Rica con 20% de presencia, México y El Salvador un 6,7% por país, y el otro 6,7% restante de muestras no declara el país de procedencia.

Gráfica 5 Procedencia de las muestras de atún



4.6 Documentación asociada a la validación

Durante la validación de la técnica elegida y como parte de los requisitos solicitados por el Sistema de Gestión de Calidad del INCIENSA, se procedió a elaborar diferentes documentos con los cuales se respalda la misma, estos documentos se elaboran siguiendo lineamientos internos del instituto, se clasifican en procedimientos, instructivos y registros según la naturaleza de estos.

Los documentos elaborados fueron los siguientes:

a) Procedimiento

CNRBRO-PE32 Determinación de mercurio en atún en conserva.

b) Instructivo

CNRBRO-IN51 Operación del Digestor de Microondas. (**Ver anexo 1**)

CNRBRO- IN50 Uso del Absorción Atómica utilizando empleando el módulo FIAS para análisis de mercurio.

c) Registros

CNRBRO-R75 Hoja de cálculo para la estimación de mercurio en pescado.

CNRBRO-R51 Uso del Digestor de Microondas.

Cada uno de los documentos elaborados surge como una necesidad de documentar el quehacer del laboratorio en aras de mejorar y brindar el mejor servicio a la población costarricense.

No obstante, por decisión del Sistema de Gestión de Calidad del INCIENSA en la sección de Anexos solo se adjuntará el instructivo CNRBRO-IN51 Operación del Digestor de Microondas.

V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se pretende detallar las conclusiones de acuerdo con los puntos propuesto en los objetivos presentes en esta investigación, además aportar las recomendaciones finales que fueron dándose durante la verificación de la validación del método analítico y la determinación de mercurio presente en algunas latas de atún en conserva.

Conclusiones

- a. Se logró identificar siete metodologías utilizadas para la determinación de mercurio en atún.
- b. Para el proceso de validación del método 971.21 Mercurio en alimentos de la AOAC se analizaron los diez parámetros establecidos en el PG 14-validación y verificación de métodos del INCIENSA.
- c. Hay una excelente concordancia (veracidad) entre el valor promedio obtenido y el valor determinado en la ronda interlaboratorio realizada por FAPAS.
- d. Límite de cuantificación: se logró cuantificar una concentración de mercurio 12.5 veces más pequeña que límite máximo permitido, según el RTCR 4069:2008 34687-MAG, Costa Rica lo que demuestra que el método es muy sensible.
- e. Se encontró un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos, para la repetibilidad y reproducibilidad.
- f. Los resultados obtenidos del análisis de las muestras comerciales de atún, permiten concluir que todas se encontraban dentro de lo establecido por la normativa vigente.

Recomendaciones

- a. Se logró cumplir con cada uno de los objetivos propuestos, sin embargo, se brindan algunas recomendaciones que permitirán mejorar aspectos generales si se desea ampliar el alcance propuesto.
- b. En un futuro lo ideal sería analizar mayor cantidad de muestras de atún presentes en el mercado costarricense, debido a la gran cantidad existente en la actualidad.
- c. Elaborar un historial del contenido de mercurio tomando en cuenta la información importante como marca y presentación.

VI REFERENCIAS

- Alimentos Prosalud. (2018). *Alimentos Prosalud*. Obtenido de http://www.alimentosprosalud.com/tesoro-del-mar#ctg_9
- Bernal, C. A. (2010). *Metodología de la investigación*. Bogotá: Pearson Educación de Colombia Ltda.
- Calderón, D. H. (23 de 05 de 2011). *bvsper.paho.org*. Obtenido de bvsper.paho.org:
http://bvsper.paho.org/videosdigitales/matedu/cam2011/Fuentes_informacion.pdf?ua=1
- Camacho, A. C. (11 de agosto de 2013). 18 marcas de atún dinamizan el mercado costarricense. *El Financiero*. Obtenido de http://www.elfinancierocr.com/negocios/atun-conserva-mercado-marcas-Calvo-AlimentosProSalud_0_351564862.html
- Chaves, I. R. (12 de 4 de 2016). Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado. *Pensamiento Actual*, 113-119. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5821455.pdf>
- Cifuentes, J. L., Torres, P., & Frías, M. (1997). La ciencia para todos. En *El océano y sus recursos I. Panorama Oceánico*. Ciudad de México : Fondo de Cultura Económica . Obtenido de http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_22.htm
- Comisión del Codex Alimentarius. (febrero de 2013). *Documento de debate sobre la revisión del nivel de referencia para el metilmercurio en el pescado y peces depredadores*.
- Comisión Europea. (28 de marzo de 2007). *Diario Oficial de la Unión Europea*. Obtenido de *Diario Oficial de la Unión Europea*: <https://www.boe.es/doue/2007/088/L00029-00038.pdf>
- Corredor, C. (2013). *Estado del arte sobre la presencia de mercurio en peces y su efecto en la salud*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11996/CorredorRodriguezCamila2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Cortés, C. E. (2017). *Determinación de mercurio orgánico e inorgánico en muestras ambientales*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/59820/1/52352227.2017.pdf>
- Damin, I., Santo, M., Hennigen, R., & Vargas, D. (5 de setiembre de 2013). Validation of a hydride generation atomic absorption spectrometry methodology for determination of mercury in fish designed for application in the Brazilian national residue control plan. *Journal of Environmental Science and Health*, 1108-1110. Obtenido de Taylor & Francis.
- Duque, G., Marrugo, J., Suárez, H., & Wills, A. (2015). *Evaluación de riesgo de mercurio en peces de aguas continentales en Colombia*. Bogotá: ERIA. Recuperado el 20 de junio de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/309679739_Evaluacion_de_riesgo_de_mercurio_en_peces_de_aguas_continentalas_en_Colombia
- ECA. (2014). *Guía para la validación de métodos*. San José.
- Escribá, C. (2007). *Cuantificación de mercurio (Hg), por la técnica de espectrometría de absorción atómica con celda de vapor frío (FIAS), en muestras de carne de tiburón provenientes de las Costas del Atlántico y Pacífico de la República de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2503.pdf
- España, Eurolab. (01 de 01 de 2016). www.eurachem.org. Obtenido de www.eurachem.org: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_E_S.pdf
- Eurolab España. (2016). La adecuación al uso de los métodos analíticos. En P. M. Colaboradores, *La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (págs. 6-7). Barcelona: Eurolab.
- Eurolab España. (2016). La adecuación al uso de los métodos analíticos. En P. M. Colaboradores, *La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (págs. 1-13). Barcelona: Eurolab.
- Eurolab España. (2016). La adecuación al uso de los métodos analíticos. En P. M. Colaboradores, *La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (pág. 23). Obtenido de

https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

FAO. (2004). *Información sobre la ordenación pesquera de la República de Costa Rica*. Obtenido de <http://www.fao.org/fi/oldsite/FCP/es/cr/body.htm>

Fernández, Ó. (28 de 06 de 2018). Conceptos de absorción atómica. (G. B. Núñez, Entrevistador)

Gaioli, M., Amoedo, D., & González, D. (junio de 2012). Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 110(3). Obtenido de <http://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2012/v110n3a18.pdf>

García, G. (octubre de 2010). Determinación de mercurio por generación de vapor frío y detección vía absorción y fluorescencia atómica. *Sertenejas*. Obtenido de <http://159.90.80.55/tesis/000149413.pdf>

Garita, L. A. (2016). Guía didáctica de los TFG en EAE-TEC. En L. A. Garita Pacheco, *Guía didáctica de los TFG en EAE-TEC* (pág. 40). Cartago: TEC.

Hannaford, P. (2000). *Historical Records of Australian Science*. Obtenido de Historical Records of Australian Science: <https://www.science.org.au/fellowship/fellows/biographical-memoirs/alan-walsh-1916-1998>

Hurtado, R. (11 de octubre de 2017). *Nutrición por tu salud*. Recuperado el 23 de junio de 2018, de *Nutrición por tu salud*: <https://nutricionportusalud.com/atun/>

IARC. (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *International Agency For Search on Cancer*, 58. Obtenido de <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/mono58-8.pdf>

INCIENSA. (10 de octubre de 2015). *Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, INCIENSA*. Obtenido de <https://www.inciensa.sa.cr/>

Jimenez, M. (2009). Desarrollo de métodos analíticos para especiación de mercurio y su aplicación a la comarca de almadén. En T. Jackson, *Mercury in aquatic ecosystems* (pág. 27). Cuenca: Universidad de Castilla-La Mancha. Obtenido de <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/997/264%20Desarroll>

o%20de%20m%C3%A9todos%20anal%C3%ADticos.pdf?sequence=1&isAllowed=y

La Nación . (21 de marzo de 2016). Costa Rica importa siete veces más atún que en 2007. *La Nación*. Obtenido de http://www.nacion.com/economia/consumidor/Costa-Rica-importa-veces-atun_0_1549845014.html

LANASEVE. (13 de marzo de 2016). Evaluación de los Niveles de Mercurio en Productos Pesqueros en Costa Rica, Durante 2003-2013, como insumo para recomendar una ingesta semanal tolerable. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 25, 19. Obtenido de <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rcsp/v25n1/1409-1429-rcsp-25-01-00018.pdf>

Lima, K. (2010). *Evaluación de los niveles de mercurio total y mercurio orgánico en muestras de suelos procedentes de Instituciones Educativas del pueblo "El Callao", Estado Bolívar, Venezuela*. Caracas . Obtenido de <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/11968/1/Tesis%20Karla%20Lima.pdf>

López, P. (2004). *Scielo*. Recuperado el 18 de noviembre de 2018, de Scielo: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1815-02762004000100012

Mañay, N., Clavijo, G., & Díaz, L. (24 de 07 de 2018). *riquim.fq.edu.uy*. Obtenido de [riquim.fq.edu.uy:riquim.fq.edu.uy:riquim.fq.edu.uy: http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/02ba23e6cc083af03bfc55ac63a98a0c.pdf](http://riquim.fq.edu.uy:riquim.fq.edu.uy:riquim.fq.edu.uy/archive/files/02ba23e6cc083af03bfc55ac63a98a0c.pdf)

Marviva. (13 de agosto de 2012). *Guía de identificación de filetes de pescado y mariscos*. Obtenido de http://marviva.net/sites/default/files/documentos/guia_de_identificacion_de_filetes_de_pescado_y_mariscos.pdf

Mozaffrain, D. (octubre de 2006). Fish intake, contaminants, and human health: Evaluating the risks and the benefits. 10.

Nascimento, A., Mgalhaes, L., Kikuchi, A., Furtado, D., Araujo, M., & Melo, M. (18 de Enero de 2012). Method validation for the determination of total mercury in fish muscle by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Food Additives and Contaminants Vol. 19, No. 4*, 620-621.

- OAA. (2013). *Guía para la validación de métodos de ensayo*. Buenos Aires: Organismo Argentino de Acreditación. Obtenido de <http://www.oaa.org.ar/docs/GUI-LE-03%20v1.pdf>
- Olson, R., & Watters, G. (2003). A model of the pelagic ecosystem in the eastern tropical Pacific Ocean. *Inter-American Tropical Tuna Commission*, 22(3), 1-17.
- Organismo Salvadoreño de Normalización. (2017). www.osn.gob.sv. Obtenido de www.osn.gob.sv:
http://www.osn.gob.sv/index.php?option=com_content&view=article&id=86&Itemid=184
- Piña, X., Rojas, G., Lué-Merú, P., & Torres, J. (22 de octubre de 2012). Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/933/93325703007.pdf>
- Regnell, O., & Ewald, G. (1997). Factors controlling temporal variation in methyl mercury levels in sediment and. En O. Regnell, & G. Ewald, *Factors controlling temporal variation in methyl mercury levels in sediment and* (Vol. 8, págs. 1784, 1793). Lund, Suecia: American Society of Limnology and Oceanography. Obtenido de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4319/lo.1997.42.8.1784/pdf>
- Rivera, R. (2001). *Determinación del nivel de concentración de mercurio en especies de atún de exportación*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/729/4/TESIS%20-%20%202.pdf>
- Rodríguez, I. P. (2001). *Evaluación y desarrollo de metodologías para la determinación de elementos traza en aceros por ICP-MS*. Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/4335/1/T25502.pdf>
- Ruiz, I. C. (2016). *Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado*. San Ramón : Revista Pensamiento Actual. Obtenido de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/pensamiento-actual/article/view/25187>
- Torres, S. E. (2012). *Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico*. Valencia : Universitat de València. Obtenido de <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/23244/torres.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Vega, L. B., Arias, J. V., Beltrán, G. L., Castro, O. D., & Moreno, O. T. (2000). *Validación de un método para determinar metilmercurio en tejido de pescado por cromatografía de gases*. Habana : Revista Cubana de Alimentación y Nutrición . Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol14_2_00/ali05200.htm
- Vinagre, J. (1997). *Calidad de métodos analíticos*. Santiago: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S00.htm#Contents>
- Westgard, J. (2008). *Validación básica de método*. QC Westgard. Obtenido de <http://www.ifcc.org/media/333585/2015%20Validaci%C3%B3n%20B%C3%A1sica%20de%20M%C3%A9todo.pdf>
- World Health Organization. (2002). *Validación de métodos analíticos*. Obtenido de http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACIoN_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
- World Health Organization. (2007). *Exposure to Mercury: a major public health concern*. Ginebra: World Health Organization. Obtenido de <http://www.who.int/phe/news/Mercury-flyer.pdf>

VII GLOSARIO

Agua desionizada: Es aquella a la cual se le han removido los cationes, tales como el sodio, calcio, hierro y cobre; y los aniones, por ejemplo: carbonato, fluoruro y cloruro, mediante un proceso de intercambio iónico.

Agua destilada: Es aquella agua a la que se le ha eliminado la mayoría iones e impurezas orgánicas mediante un proceso de destilación.

ANOVA: Análisis de Varianza

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

Atún en conserva: Atún obtenido de la limpieza regular de las especies Aleta Amarilla (*Thunnus Albacares*), Skipjack (*Katswonus Pelamis*), Bigeye (*Thunnus Obesus*), Albacora (*Thunnus Alalunga*), en los cuales se conserva la estructura muscular y desmenuzado del mismo atún con dimensiones menores a 1.2 cm. El atún debe presentar características de color y olor típicos de la especie. Atún en medio de cobertura aceite y/o agua.

°C: grados centígrados

cm: centímetros

CV: Coeficiente de Variación

DS: Desviación estándar

g: gramos

Homocedasticidad: es una propiedad fundamental del modelo de regresión lineal general y está dentro de sus supuestos clásicos básicos. Se dice que existe homocedasticidad cuando la varianza de los errores estocásticos de la regresión es la misma para cada observación.

HNO₃: Ácido nítrico

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

Kg: kilogramo

Km/h: kilómetros por hora

l: Litro

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

m: metro

m/m: masa/masa

mm: milímetro

mg: miligramo

ml: mililitro

NaBH₄: Borohidruro de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

Ng: nanogramos

NaOH: Hidróxido de sodio

NH₂OH*HCl: Cloruro de hidroxilamina

(NH₃OH)₂ SO₄: Sulfato de hidroxilamina

KMnO₄: Permanganato de potasio

ppm: partes por millón.

ppb: partes por billón.

RSD: Desviación Estándar Relativa

RTCR: Reglamento Técnico Costa Rica

SnCl₂: Cloruro de estaño

STD: Estándar (siglas en inglés)

µg: microgramo

VIII ANEXOS

Anexo 1 Operación del Digestor de Microondas

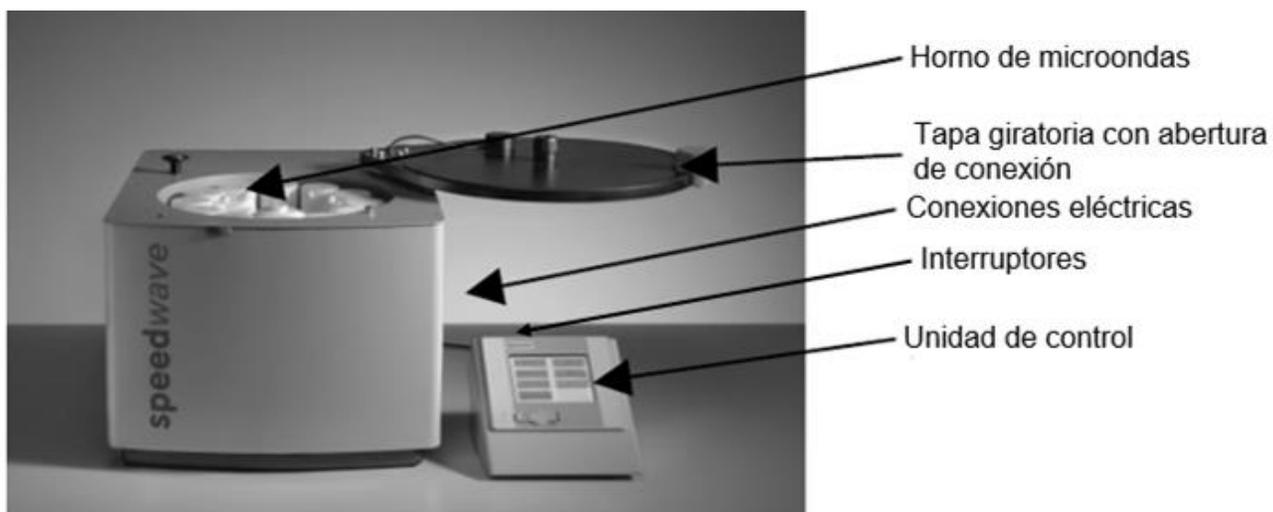
Desarrollo

Información del equipo

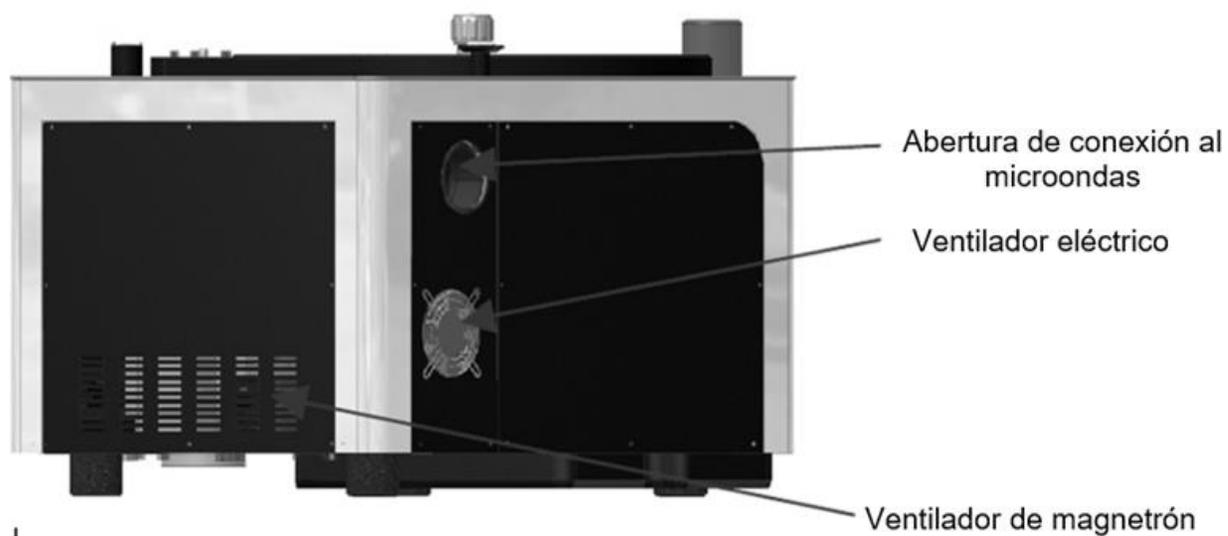
Marca:	BERGHOF
Modelo:	Speedwave four
N° Serie:	000590
Identificación:	0752-001109
Ubicación:	Laboratorio A

Características técnicas

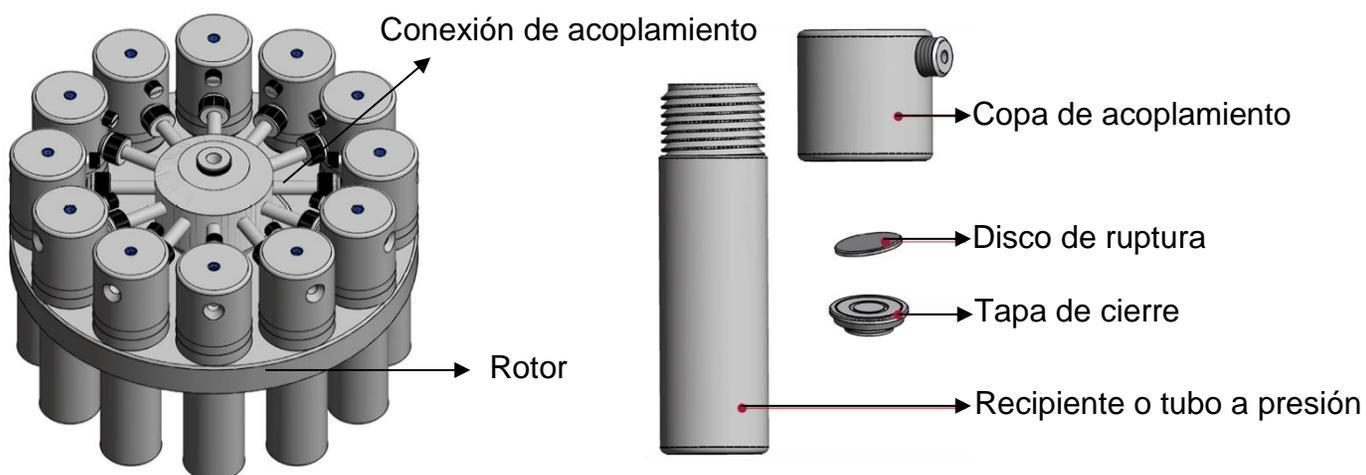
Fuente de alimentación:	230 V
Frecuencia:	50/60 Hz
Corriente:	10 A
Consumo de energía:	2000 W
Fusibles:	2*12.5 AT, Dos fases
Frecuencia del Magnetrón:	2450 MHz
Potencia del microondas:	1, 450 W
Dimensiones exteriores:	640*570*430 mm
Dimensiones internas:	360 mm
Capacidad mínima:	2 recipientes o tubos
Capacidad máxima:	12 recipientes o tubos
Material de los tubos:	TFM
Peso:	65 kg
Nivel de ruido:	< 60 Db
Rango de temperatura DIRC:	50 °C-300 °C
Rango de sensor de presión:	0-150 bar (2180 psi) Monitor 0-100 bar (1450 psi)
Controles:	Poder PC 5200 (5,7 pantalla táctil)
Memoria del programa:	200 programas, 25 preprogramados
Memoria de archivo de datos:	min. 500 archivos de datos
Monitor:	320*240 pixeles
Interface:	RS-232, Ethernet, USB



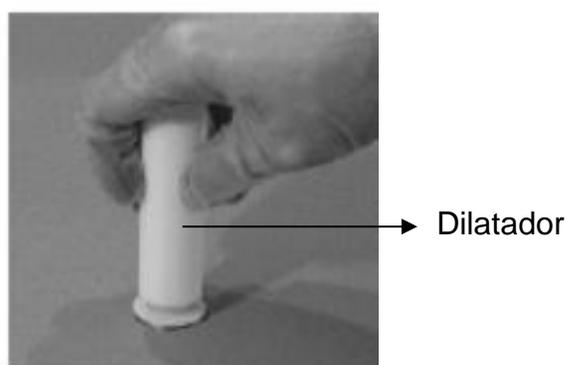
(Figura 1) Vista detallada del equipo Digestor de Microondas (adelante)



(Figura 2) Vista detallada del equipo Digestor de Microondas (atrás)



(Figura 3) Vista detalla de los tubos de digestión



(Figura 4) Accesorios del equipo

Uso

El sistema de Microondas Speedwave four está diseñado para la digestión a presión a temperaturas de hasta 230 °C (446 °F) en uso continuo a 300 °C (572 °F), y dependiendo del tipo de recipientes empleados, presiones hasta un máximo de 100 bar (1450 psi).

Este es un microondas de carga superior hecho de acero inoxidable 1.4301 (SS 304) y equipado con una tapa de seguridad giratoria con mecanismo de bloqueo electromecánico y una cámara circular para la distribución uniforme de microondas. El horno tiene un alto recubrimiento de PFA (PERFLUORO/ALCANO ALCÓXIDO) resistente a químicos, protegiéndolo de la corrosión, donde la cámara está permanentemente aireada por un ventilador especial.

Adentro del horno de microondas, se encuentra un termómetro DIRC que permite que la temperatura del contenido de los recipientes sea rápidamente determinada y controlada. Opcionalmente, el sistema está equipado con un monitoreo de presión sin contacto directo para cada recipiente, esto registra la presión interna del recipiente, por seguridad, si la presión se acerca a su máximo nivel, el sistema automáticamente cambia a un modo de presión moderada.

Modo de operación

Para el uso correcto del equipo de digestión por microondas, es recomendable seguir los siguientes pasos:

Antes de iniciar anótese en el registro CNRBRO-R84 Uso del digestor de microondas.

1. Se conecta el enchufe de la regleta al tomacorriente, y se enciende la regleta, luego se presiona el interruptor que está al lado derecho del digestor de microondas para encenderlo.



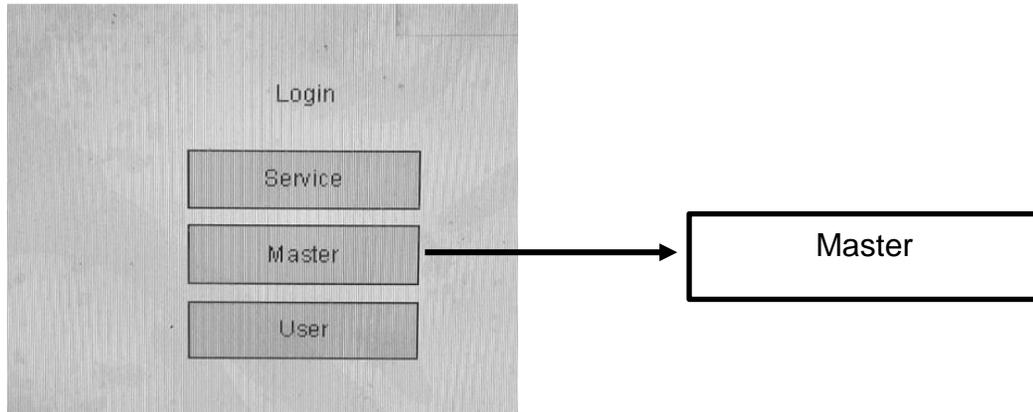
(Figura 5) Digestor de microondas (lado derecho)

2. Se presiona el interruptor que está detrás de la unidad de control para encender este dispositivo, se espera al menos 30 s mientras carga el software.



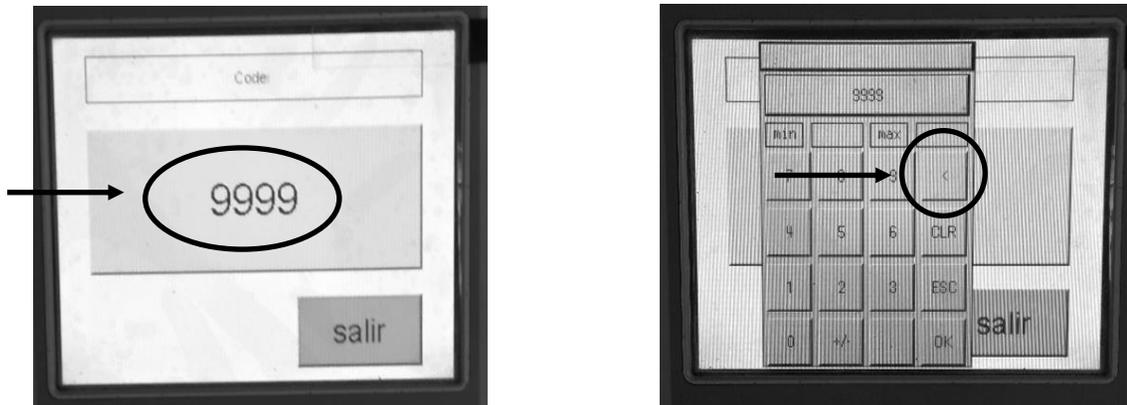
(Figura 6) Unidad de control (atrás)

3. Inmediatamente aparece en la pantalla de la unidad de control, la ventana Login con tres opciones para ingresar al software. Se selecciona la segunda opción:



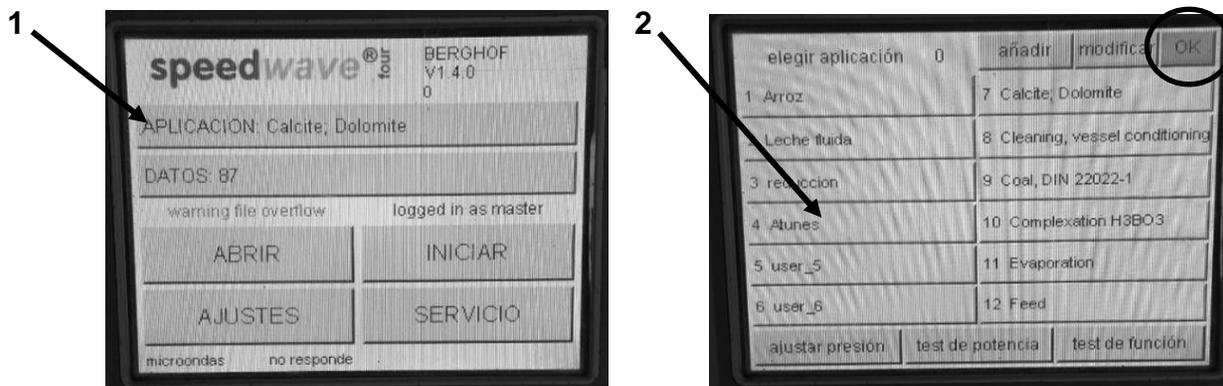
(Figura 7) Ventana login del Digestor de microondas

4. Seguidamente, aparece la ventana Code, se debe ingresar la clave de acceso (no existe clave de acceso) para ello se presiona el recuadro amarillo, inmediatamente, aparece un recuadro gris, donde se procede a borrar los números que aparecen en dicho recuadro, haciendo uso del símbolo <, por último, se selecciona la opción OK.



(Figura 8) Ventana code del Digestor de microondas

5. Posteriormente en la pantalla de la unidad de control, se muestra la ventana de inicio, se selecciona la opción APLICACIÓN, se desplegará el menú con las diferentes aplicaciones del equipo, se elige la aplicación que corresponda y se presiona OK. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de cómo seleccionar una aplicación.



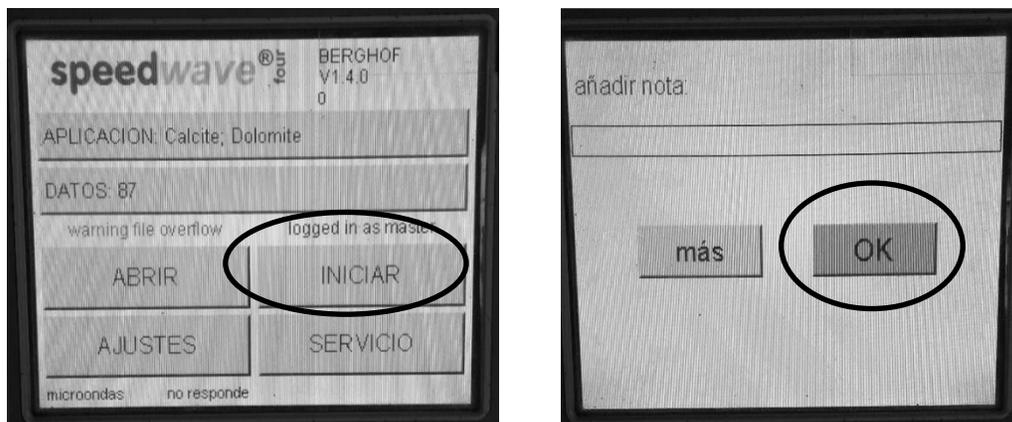
(Figura 9) Selección de la aplicación correspondiente

6. El software vuelve a la pantalla de inicio, se escoge la opción ABRIR, y haciendo uso de la manilla roja que está en la tapa giratoria, se desliza la tapa hacia la derecha.



(Figura 10) Pantalla de inicio

7. Se selecciona en la pantalla de inicio la opción INICIAR, seguidamente la opción OK, se abrirá una ventana con los datos registrados en el software para la aplicación que corresponda en este caso la aplicación Atunes, las aplicaciones se pueden modificar según las necesidades del método.

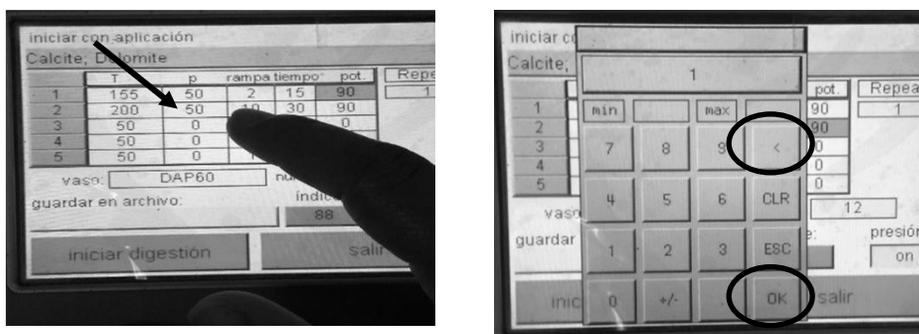


(Figura 11) Modo de inicio

- a. Si se desea modificar las opciones, se puede seguir los siguientes pasos:

I. Parámetros de la Digestión de microondas

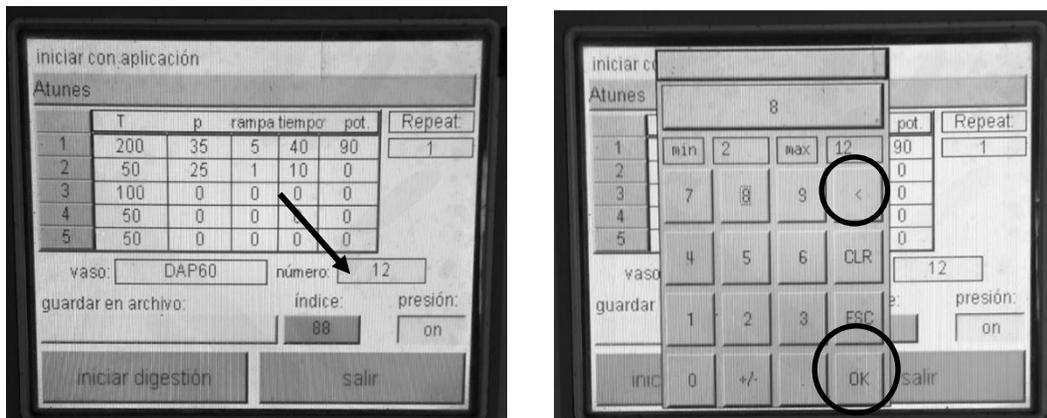
Estas condiciones pueden ser modificadas, dependiendo del tipo de matriz a digerir, se aplican diferentes condiciones de temperatura, presión, tiempo y potencia, si se desea ajustar o cambiar alguna característica establecida por el equipo, se posiciona sobre el parámetro que aparece en la pantalla, con ayuda del símbolo < se borran los datos, después se digita la nueva condición y se presiona la opción OK.



(Figura 12) Condiciones óptimas del equipo

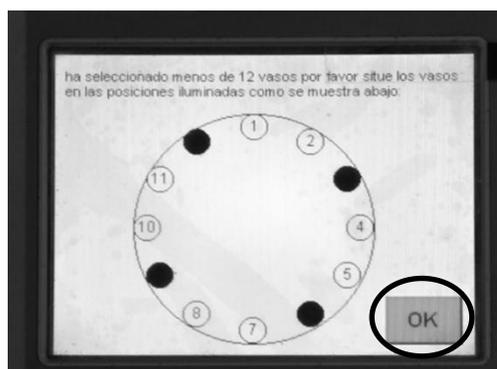
II. Número (número de tubos)

Se presiona la celda titulada número, se edita la pantalla que aparece con el número de tubos por introducir, para borrar los que están en la memoria del equipo se usa el símbolo <, después se coloca la cantidad de tubos a utilizar, seguidamente se presiona la opción OK.



(Figura 13) Modificación número de tubos

Cuando se seleccionen menos tubos de la capacidad total del equipo, aparece una pantalla en la que se indica por medio de posiciones numeradas, en color negro se señala las que no se usan (ver figura 14). Y en los otros, se ubica cada tubo en el rotor del digestor de microondas, estos se enroscan a la conexión de acoplamiento, respetando la indicación dada por el equipo. Posteriormente se presiona la opción OK y se procede a cerrar la tapa del digestor, haciendo uso de la manilla roja que está en la tapa giratoria, hasta que haga clic.

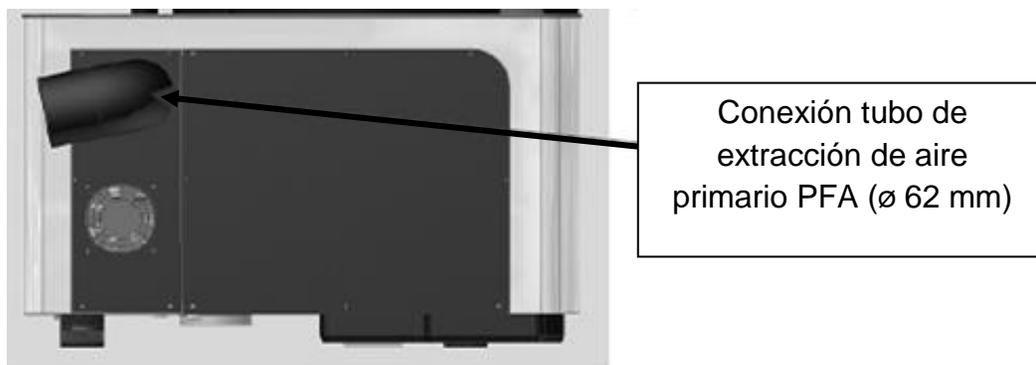


(Figura 14) Modificación cantidad de tubos

- b. Sin modificaciones: se inserta cada tubo al rotor del Digestor de microondas, ocupando las doce posiciones (1 a 12), cada tubo se enrosca a la conexión de acoplamiento. Una vez colocados los tubos en la posición adecuada, se procede a cerrar la tapa del digestor, haciendo uso de la manilla roja que está en la tapa giratoria, hasta que haga clic.

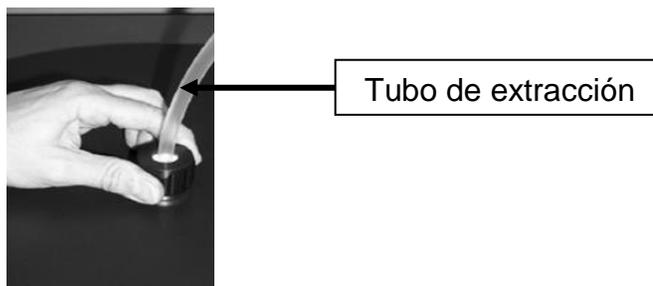
Nota: si se tiene algún inconveniente durante esta parte del proceso se puede seleccionar la opción salir, inmediatamente regresa a la pantalla de inicio y se procede según lo indicado en el punto 8.

8. Se coloca el tubo de extracción de aire primario (\varnothing 62 mm) en la apertura de conexión al microondas y se introduce el otro extremo en la campana de extracción.



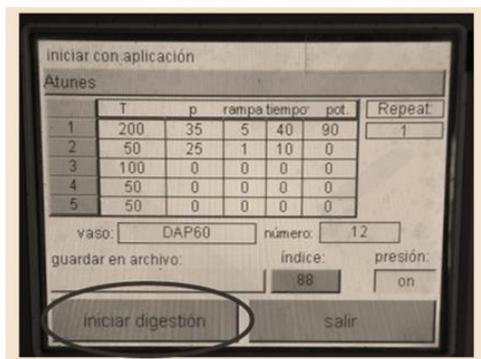
(Figura 15) Colocación tubo de extracción de aire primario

9. Se coloca el tubo de extracción de aire secundario (\varnothing 10 mm) en el orificio de la tapa giratoria con abertura de conexión del digestor de microondas, se ajusta girando la rosca al lado izquierdo y se introduce el otro extremo en la campana de extracción.



(Figura 16) Colocación tubo de extracción de aire secundario

10. Se procede a seleccionar la opción iniciar digestión y se espera a que esta concluya.



(Figura 16) Inicio de la digestión

11. Transcurrido el tiempo de la digestión, en la pantalla aparece un mensaje "digestión finalizada" y la opción OK, al presionar esta última se regresa a la pantalla de inicio, posteriormente se desenrosca y se quita el tubo de extracción de aire secundario, se presiona la opción ABRIR y se abre la tapa, haciendo uso de la manilla roja que está en la tapa giratoria y con mucha precaución, se desenrosca cada tubo de la conexión de acoplamiento del equipo y se sacan uno a uno los tubos de teflón. Tener especial cuidado al abrir la tapa y sacar los tubos, ya que puede haber temperaturas y presiones altas.
12. Posteriormente se deja la tapa abierta por al menos 20 min para enfriar el equipo.
13. Por último, se desconecta el tubo de extracción de aire primario, se cierra la tapa haciendo uso de la manilla roja que está en la tapa giratoria, se apaga el digestor y la pantalla de la unidad de control presionando el interruptor de cada una de ellas, se apaga la regleta y por último se retira el enchufe del tomacorriente.