



ITSON

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO
PRESENTA

CD. OBREGÓN SONORA,

NOVIEMBRE 2006.

DEDICATORIAS

A DIOS POR OTORGARME SALUD Y FUERZA PARA SEGUIR
ADELANTE.

A MIS PADRES Y MIS HERMANOS POR EL APOYO Y EL AMOR
QUE ME BRINDAN SIEMPRE.

A MI PADRE DE LA CARRERA Y ASESOR ROBERTO GARCÍA
POR SU ENSEÑANZA Y CONFIANZA LO LARGO DE ESTOS
ÚLTIMOS AÑOS.

AGRADECIMIENTO

A DIOS POR DARME ESTA GRAN OPORTUNIDAD DE
MANIFESTAR MIS CONOCIMIENTOS.

A MIS PADRES FLORENCIO Y MARIA DE JESÚS POR SUS
CONSEJOS DE LA VIDA Y ENSEÑARME A NO DESISTIR.

A MIS HERMANOS PEPE E IVONNE POR ENSEÑARME A
TENER PACIENCIA.

A MIS AMIGOS CON LOS CUALES CONTÉ A LO LARGO DE MI
CARRERA GRACIAS POR SU AMISTAD.

A MIGUEL ANTONIO POR SU COMPRENSIÓN Y CARÍÑO
GRACIAS.

A MIS MAESTROS REVISORES EN ESPECIAL, MERCEDES
MEZA POR SU APOYO Y ENSEÑANZA.

A MAESTRA ANNA RENTERÍA POR SUS CONCEJOS QUE ME
HAN MEJORADO Y TRANQUILIZADO.

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
I. INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	4
HIPÓTESIS.....	5
II REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	
2.1 Características fisicoquímicas de la cabeza de camarón.....	6
2.2 Digestión Orgánica.....	8
2.3 Microelementos.....	8
2.4 Validación de métodos analíticos.....	9

2.5 Espectroscopia de absorción atómica.....	11
2.6 Instrumentación.....	11
2.6.1 Fuente de luz.....	11
2.6.2 Atomizador.....	12
2.6.3 Atomización a la flama.....	13
2.6.4 Atomizadores electrotérmicos.....	15
2.7 Ley de Lambert-Beer.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Descripción general.....	18
3.2 Calibración del equipo.....	19
3.3 Solución estándar.....	19
3.4 Preparación de la muestra por triplicado.....	19
3.5 Cálculos.....	20
3.6 Material.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Preparación de la muestra.....	22
4.2 Precisión del método.....	23
4.3 Curvas estándar.....	25
4.4 Recuperación del método.....	28
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

LISTA DE TABLAS

1. Composición química del camarón.....	7
2. Longitudes de onda para cada elemento.....	20
3. Diseño experimental para determinar el tiempo óptimo de digestión...	24
4. Absorbancia para soluciones estándares de Mn.....	25
5. Absorbancia para soluciones estándares de Cu.....	26
6. Calibración y precisión del método.....	27
7. Resumen de los cálculos de validación del método analítico.....	28

LISTA DE FIGURAS

1. Partes del Espectrómetro de Absorción Atómica.....	15
2. Curva de calibración de soluciones estándares de Mn.....	26
3. Curva de calibración de soluciones estándares de Cu.....	27

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la validación de un método analítico por espectroscopía de absorción atómica para cuantificar los microelementos manganeso y cobre en cabeza de camarón, se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto Tecnológico de Sonora. Para seleccionar el tamaño de muestra adecuada fue necesario desarrollar un método experimental variando cantidades de muestra entre: 0.5, 1.0 y 1.5 g y sometiéndose a diferentes tiempos de digestión de: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 horas; utilizando una mezcla de ácidos nítrico y perclórico en proporciones variables de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 y 5:1. La muestra seleccionada para la validación del método analítico fue la de 1.5 g y mezcla digestora de 5:1 en tiempo de digestión de 0.5 horas siendo el de menor tiempo y buena clarificación de la solución digestora resultante. En los extractos de las muestras digeridas se analizaron Cu y Mn por espectroscopia de absorción atómica. Los resultados analíticos que se obtuvieron para estos minerales son aceptables en cuanto a su precisión y exactitud. Las muestras analizadas presentaron un coeficiente de variación de 0.028 para Cu y 0.014 para Mn; con 90 por ciento de recuperación para ambos elementos, siendo así aceptable para el método analítico.

I. INTRODUCCION

Es muy conocido el uso de harina de cabeza de camarón en la cocina tradicional Mexicana, potenciando el sabor de los platillos de origen marino, de ahí surge el interés de validar métodos analíticos para la cuantificación de estos microelementos que para este estudio se limita solo a dos de ellos, Debido al tiempo estimado y costo ya que es un proyecto académico.

Los micronutrientes metálicos no aportan energía, sino que constituyen unos factores de colaboración esenciales para que el metabolismo funcione. Aunque estos nutrientes se necesitan en cantidades muy pequeñas, son sin embargo los elementos alimentarios clave. Y por lo tanto los micronutrientes necesarios para no desarrollar alguna enfermedad por falta de los mismos. Sin ellos no tendrían lugar los procesos de crecimiento y producción de energía, al igual que otras muchas funciones normales. Con el consumo de los alimentos marinos son la principal fuente de metales para los habitantes de las regiones costeras, pero también son consumidos en la región. Los elementos traza son continuamente liberados al mar por vía natural y por actividades antropogénicas (Hashmi, 2002).

Al igual que en las plantas, los micronutrientes son tan importantes como los nutrientes primarios y secundarios, a pesar de que la planta los requiere solamente

en cantidades muy pequeñas. La ausencia de cualquiera de estos micronutrientes en el suelo puede limitar el crecimiento de la planta, aun cuando todos los demás nutrientes esenciales estén presentes en cantidades adecuadas (Szefer, 2002).

La determinación de micronutrientes en un alimento, que en este caso es la harina de camarón es importante, así se logra confirmar que el alimento que se esta ofreciendo, o proporcionando tiene los nutrientes, así como también la determinación de los elementos minerales en peces es importante debido a sus efectos en la salud humana; son nutricionales si el consumo es óptimo en los minerales esenciales tales como Cu, Fe, Mn, Zn, Co, Ni, Cr, Mg, Ca, Na, y K son necesarios para mantener buen estado de salud (Szefer, 2002).

La Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA) es una técnica de análisis instrumental, capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos comprendidos en el sistema periódico. Este método consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda específica. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo. Este instrumento es muy completo y tiene muchas aplicaciones para análisis clínicos ambientales, biológicos, farmacéuticos, metalurgia y derivados del petróleo entre otros (Skoog, Holler, Nieman, 2001).

La validación consiste en la obtención de pruebas con arreglo a las normas de correcta fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema de producción el resultado es previsto, en los cuales se utiliza la selectividad, linealidad, rango, precisión, repetibilidad, precisión intermedio, reproducibilidad y exactitud del método (J. López y D. Sánchez, 2003, Apuntes de un taller de validación de técnicas analíticas).

1.1 Objetivos

Objetivo General

Validar el método de análisis de los micronutrientes cobre y manganeso en harina de cabeza de camarón a través de la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica, para su determinación cuantitativa.

Objetivos Específicos

Proponer una metodología de digestión ácida en harina de cabeza de camarón para la determinación de micronutrientes con su previo análisis estadístico.

Determinar la concentración de micronutrientes en harina de cabeza de camarón con la ayuda de un método instrumental EAA de análisis para el establecimiento de diferencias significativas entre ellos.

Obtención de datos analíticos para la validación de los métodos de análisis

1.2 Justificación

La importancia de la validación en métodos analíticos radica en proporcionar la seguridad, confianza y reproducibilidad de los resultados. Siendo esta indispensable para mantener una alta calidad en el control de laboratorio, ya que en la actualidad la validación de los métodos analíticos esta siendo implementada como requisitos básicos en los laboratorios que deseen tener una mayor calidad y prestigio en sus resultados. Además es un procedimiento importante que se debe cumplir dentro de las normas ISO para asegurar la veracidad de los resultados, y de esta manera contar con métodos analíticos que estén certificados bajo normas internacionales.

1.3 Hipótesis

La digestión ácida de la harina de cabeza de camarón es favorecida en tamaño de muestra no mayor a 2 g para validar satisfactoriamente los elementos Cobre y Manganeso por Espectroscopia de Absorción Atómica.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características fisicoquímicas de la cabeza de camarón

El camarón es un crustáceo decápodo, macruro de color variable. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en dos partes, cefalotórax y abdomen. El camarón es excepcionalmente nutritivo, es el alimento con más alto contenido de proteínas y bajo en grasas (Tabla1). Además este ha sido utilizado para extraer productos de alto valor comercial como quitina y pigmentos. Las secuencias de aminoácidos. Que conforman a las proteínas de cefalotórax (cabeza y cola) de camarón incluyen a todos los aminoácidos esenciales y constituyen el 50% del peso seco del camarón. Estas proteínas son empleadas como una fuente alimenticia y como formulación para preparar medios de cultivo para microorganismos (Rosas 2005).

Así como el Camarón, todos los demás invertebrados acuáticos acumulan metales traza de los alimentos, de la materia suspendida o directamente del agua del mar; algunos metales son esenciales para su metabolismo. Algunos invertebrados marinos pueden acumular ciertos metales específicos en cantidades aún mayores

que del medio ambiente y otros, acumular en cantidades menores del mismo metal (Zsefer, 2003).

Los componentes minerales, juegan un rol vital en el correcto desarrollo y buena salud del cuerpo humano. El consumo irregular de los elementos minerales es el problema nutricional de una gran población mundial. Su biodisponibilidad, depende de un gran número de factores tal como la forma química de los minerales contenidos en los alimentos consumidos, el consumo diario, el tipo y forma de procesado y la presencia de sustancias que incrementan o reducen su biodisponibilidad (Neiland, 2001).

Tabla 1. Composición química del camarón

Componente	Cantidad porción comestible
Agua	78.2%
Proteína	18.1 g
Grasa	0.8 g
Carbohidratos	1.5 g
Calorías	91.0 Kcal
Calcio	63.0 mg
Fósforo	166.0 mg
Hierro	1.60 mg
Tiamina	0.02 mg
Niacina	3.20 mg
Riboflavina	0.03 mg

Fuente: Charley, 2001.

2.2 Digestión Orgánica

Para realizar el análisis químico, las muestras de tejidos animales son previamente acondicionadas, son sometidas a procesos de descomposición y/o destrucción de la materia orgánica, también llamados de digestión que permiten destruir los componentes orgánicos y liberar los elementos minerales). Los dos procedimientos más utilizados para llevar a cabo los procesos antes mencionados son la digestión seca y la húmeda (digestión ácida). La elección de uno u otro procedimiento, es quizá, lo que más controversia ha generado, dadas las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Si bien ambos métodos están basados en la oxidación de la materia orgánica a través del uso de calor y/o ácidos, algunos analistas previenen sobre posibles pérdidas de algunos elementos al someter a las muestras a temperaturas altas (Martínez, 1999).

2.3 Microelementos

Definición y división

Los Minerales son elementos químicos imprescindibles para el normal funcionamiento metabólico y Los invertebrados marinos son una fuente rica de ciertos elementos esenciales (Go'koojlu, 2003). El agua circula entre los distintos compartimentos corporales llevando electrolitos, que son partículas minerales en solución. Tanto los cambios internos como el equilibrio acuoso dependen de su concentración y distribución. Entre estos elementos se encuentran boro, hierro, manganeso, cloro, zinc, cobre y molibdeno. Estas sustancias reciben el nombre de elementos menores o micronutrientes, porque son requeridos por las plantas en concentraciones muy pequeñas, tanto que las trazas de ellos son suficientes para cubrir las necesidades de la planta (Ray, 1980).

Los macrominerales, también llamados minerales mayores, son necesarios en cantidades mayores de 100 mg por día. Entre ellos, los más importantes que podemos mencionar son: Sodio, Potasio, Calcio, Fósforo, Magnesio y Azufre.

Los microminerales, también llamados minerales pequeños, son necesarios en cantidades muy pequeñas, obviamente menores que los macrominerales. Los más importantes para tener en cuenta son: Cobre, Yodo, Hierro, Manganeso, Cromo, Cobalto, Zinc y Selenio_(Ray, 1980).

2.4 Validación de métodos analíticos

De acuerdo con la norma ISO/IEC 17025 define como validación la “confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico determinado”.

La validación de métodos analíticos, puede ser el primero de los requisitos a implementar, con una extensión limitada a los estudios de la precisión del método, considerando que la mayoría de los laboratorios en fase de acreditación, utilizan métodos descritos en normas nacionales o internacionales. Por lo que las principales variaciones de sus resultados se relacionan con las características propias de cada laboratorio vinculadas a la precisión (Mendoza, 2004).

Según la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (cit. Por Martínez, 2005), donde citan que para lograr un buen análisis es necesario validar el método, que significa tener una evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos. Ya que validar es verificar, por medio de documentos que un método o proceso hace lo que tiene que hacer.

Selectividad: capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Linealidad: se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Rango: se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método.

Precisión: es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Se puede a tres niveles: repetibilidad: evalúa la precisión del método; precisión intermedio: evalúa la predicción frente a variaciones de analista, equipo y día; reproducibilidad: evalúa la precisión entre el laboratorio.

Repetibilidad del sistema instrumental: este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces (Rosas, 2005).

Repetibilidad del método: se efectúa con una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista. Puede realizarse con un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal o un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo específico (Martínez, 2005).

Limite de cuantificación: se define como la cantidad mínima de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.

Limite de detección: se define como la mínima cantidad de un analito en una muestra que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud (Rosas, 2005).

2.5 Espectroscopia de absorción atómica

La espectroscopia de adsorción atómica usa la adsorción de la luz para medir la concentración de la fase gaseosa de átomos. Ya que la mayoría de las muestras son sólidas o líquidas, los átomos o iones de los analitos deben ser vaporizados a la flama o en un horno de grafito. Los átomos adsorben luz visible o ultravioleta y hacen transiciones a niveles de energía más altos. La concentración del analito es determinada por la cantidad de adsorción. Aplicando la ley de Beer-Lambert directamente en la espectroscopia AA es difícil debido a la eficiencia de la atomización de la muestra de la matriz y a la no-uniformidad de la concentración, y a la longitud de la trayectoria de los átomos del analito (en el horno de grafito AA). Las mediciones de concentración son generalmente determinadas de una curva de calibración, después de haber calibrado el aparato con los estándares de concentración conocida (Skoog, Holler, Nieman, 2001).

2.6 Instrumentación

2.6.1 Fuente de luz.

La fuente de luz usualmente es una lámpara de cátodo con vacío de los elementos a ser medidos. Los láseres son también usados en estos instrumentos. Los láser son suficientemente intensos para excitar los átomos a mayores niveles de energía, esto permite a las mediciones de AA y fluorescencia atómica en un solo instrumento. La desventaja de estas angostas bandas de luz es que solo se puede medir un

elemento a la vez. Los espectrómetros de AA usan monocromadores y detectores de luz visible y UV. El principal propósito de un monocromador es separar la línea de absorción del fondo de la luz debido a las interferencias. Los instrumentos de AA reemplazan a los monocromadores con filtro de interferencia *band pass*. Los tubos fotomultiplicador son comúnmente usados como detectores de espectroscopia AA.

2.6.2 Atomizador.

La espectroscopia de AA necesita que los átomos se encuentren en fase gaseosa. Los átomos e iones de la muestra deben sufrir desolvación y vaporización a altas temperaturas como en el horno de grafito o la flama. La flama de AA solo puede ionizar soluciones analíticas, mientras que el horno de granito puede aceptar soluciones, mezclas o muestras sólidas.

La flama de AA usa una hendidura de tipo mechero para incrementar la longitud de la trayectoria y así incrementar la absorbancia total. Las muestras líquidas son aspiradas por un flujo de gas hacia una cámara de nebulación/combinación para formar gotas pequeñas antes de entrar a la flama.

El horno de grafito tiene varias ventajas sobre la flama. Es mucho más eficiente y puede aceptar directamente muestras muy pequeñas para usarse directamente. Además produce un ambiente de reducción para así oxidar fácilmente los elementos. Las muestras son puestas directamente al horno y es calentado eléctricamente en varios pasos para secar la muestra.

La diferencia más importante entre un espectrofotómetro de absorción atómica y uno de absorción molecular es la necesidad de convertir el analito en átomos libres. El proceso de convertir el analito en sólido, líquido o solución a un átomo gaseoso libre se llama atomización. Dos métodos generales de atomización son usados: atomización a la flama y atomización electrotérmica. Pocos elementos son atomizados usando otras técnicas (Manual Varian SpectrAA-50/55, 2000).

2.6.3 Atomización a la flama.

En la atomización a la flama la muestra es primero convertida en una suspensión de gotitas de la solución. Esto se logra usando un ensamble nebulizador. La muestra es aspirada en una cámara de nebulización pasando un vapor a alta presión que consiste de uno o más gases de combustión, pasa al final de un tubo capilar sumergido en la muestra. El impacto de la muestra con el vidrio produce gotas en una solución en aerosol. La suspensión en aerosol se combina con los gases de combustión en la cámara de nebulización antes de pasar al quemador donde la energía térmica de la flama desolvata la suspensión de aerosol para secar el aerosol a pequeñas, partículas sólidas. Después, la energía térmica volatiliza las partículas, produciendo vapor que consiste de las especies moleculares, especies iónicas y los átomos libres.

La energía térmica en la atomización a la flama es suministrada por la combinación de una mezcla combustible oxidante. Los combustibles comúnmente usados son aire-acetileno y óxido de nitrógeno-acetileno. Normalmente, el combustible y el oxidante son mezclados en proporciones estequiométricas; sin embargo, una mezcla rica puede ser aceptable para que los átomos sean fácilmente oxidables. El diseño más común para el quemador es con una ranura. Este quemador provee una longitud de la trayectoria para monitorear la absorbancia y una flama estable.

El quemador es montado en una fase ajustable que permite al quemador ensamblarse para moverse vertical y horizontalmente. El ajuste horizontal es necesario para asegurarse que la flama esta alineada con la trayectoria de los instrumentos ópticos. El ajuste vertical es necesario para ajustar la altura dentro de la flama en el que la absorbancia es monitoreada. Esto es importante porque dos procesos que compiten, afectan la concentración de los átomos libres. Un incremento en la residencia del tiempo resulta en una mejor eficiencia de la atomización; entonces la producción de átomos libres se incrementa con la altura. Por otro lado, una residencia muy larga de tiempo, puede conducir a la formación de

óxidos metálicos, como Cr, la concentración de los átomos libres es más grande en la cabeza del quemador. Para metales como Ag, que son difíciles de oxidar, la concentración de los átomos libres se incrementa firmemente con la altura. Otros átomos muestran perfiles de concentración que se maximizan a las características de la altura.

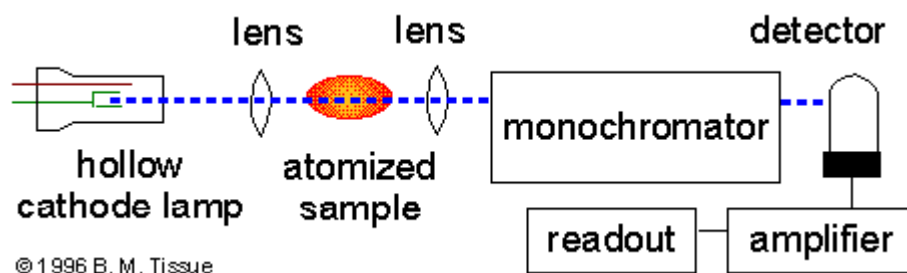
La manera más común de introducir la muestra en el atomizador de flama es por continua aspiración, en el cual la muestra es pasada continuamente a través del quemador mientras se monitorea la absorbancia. La continua aspiración de la muestra, requiere de 2-5 ml de muestra. Se puede también alimentar micro-muestras que es útil cuando el volumen es limitado o cuando la matriz de la muestra no es compatible con el atomizador de flama. Por ejemplo, la continua aspiración de muestra que contiene altas concentraciones de sólidos disueltos, como agua de mar, puede resultar en la acumulación de depósitos de sólidos en la cabeza del quemador. Estos depósitos generalmente obstruyen la flama, bajando la absorbancia. La inmersión de la muestra se logra con un muestreado automático. La alimentación de las micro-muestras a la flama se logra usando una micro-pipeta para poner 50-250 μl de muestra en un embudo de teflón conectado al nebulizador, o sumergiendo el tubo nebulizador en la muestra por corto tiempo. La sumersión de la muestra se logra con un mostrador automático. La señal para micro-muestras es un pico transitorio en el que su altura o área es proporcional a la cantidad de analito que es inyectado.

La principal ventaja de la flama por atomización es la reproducibilidad con que la muestra es inyectada en el espectrofotómetro. Una desventaja significativa que la eficiencia de la atomización puede ser muy pobre. Esto puede ocurrir por dos razones. Primero, la mayoría del aerosol producido durante la nebulización consiste de gotas que son muy grandes para ser acarreadas hacia la flama por los gases de combustión. Consecuentemente, casi el 95% de la muestra nunca llega a la flama. La segunda razón es que un volumen grande de gases de combustión

significativamente diluye la muestra. Juntas, estas contribuciones a la eficiencia de atomización pueden reducir la sensibilidad, si la concentración del analito en la flama, es de 2.5×10^{-6} en esa solución. (Manual Varian SpectrAA-50/55, 2000).

2.6.4 Atomizadores electrotérmicos.

Una significativa mejora en la sensibilidad se logró con el calentamiento por resistividad en lugar de la flama. Un atomizador electrotérmico muy común, es conocido como horno de grafito, que consiste de un tubo cilíndrico de grafito de aproximadamente 1-3 cm de longitud, y 3-8 mm de diámetro. El tubo de grafito es alojado en un ensamble que sella las salidas del tubo con ventanas ópticamente transparentes. El ensamble también permite el paso de corrientes de gas inerte, protegiendo el grafito de la oxidación, y removiendo los productos gaseosos producidos durante la atomización. Una fuente de poder es usada para pasar la corriente a través del tubo de grafito, resultando en un calentamiento por la resistencia.



Manual Varian SpectrAA-50/55

Fig. 1 partes del espectrómetro

2.7 Ley de Lambert-Beer

Según Havey, la ley de Lambert-Beer (también llamada ley de Beer-Lambert-Bouguer) es una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la absorción de la radiación electromagnética. La fórmula general de la ley es:

$$A=abc$$

Donde A: es la absorbancia a una (λ) longitud de onda, a: es el coeficiente de absorción específica, b: es el paso óptico de la luz en cm y c: es la concentración del analito en $\mu\text{g/ml}$.

Mediciones experimentales en términos de transmitancia (T) que es definida por:

$$T = \frac{P}{P_o}$$

Donde P es la intensidad de la luz a través de la muestra y P_o es la intensidad inicial de la luz, la relación entre A y T es:

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{P}{P_o}\right)$$

En aplicaciones analíticas queremos medir la concentración de analito independiente de los efectos de la reflexión, absorción del solvente, y otras interferencias (Skoog, Holler, Nieman, 2001).

Dependiendo del tipo de instrumento, la medida de referencia puede ser hecha simultáneamente con la medición de la muestra o con la referencia gravada en la computadora para generar el espectro completo.

Los modernos aparatos de absorción pueden mostrar los datos en % de transmitancia o absorbancia. Una concentración desconocida de analito puede ser determinada con la medición de la cantidad de luz que absorbe la muestra aplicando

la ley de Beer. Si el coeficiente de absorptividad no se conoce, la concentración se puede determinar usando una curva de calibración de la absorbancia contra la concentración derivada de los estándares (Havey, 2000).

Limitaciones de la ley de Lambert-Beer.

La linealidad de la ley de Lambert-Beer es limitada por los factores químicos o instrumentales. Las causas de la no-linearidad son:

- Desviaciones de los coeficientes de absorbancia a altas concentraciones ($>0.01M$) debido a las interacciones electrostáticas entre las moléculas por la proximidad.
- Dispersión de la luz debido a las partículas de la muestra.
- Fluorescencia o fosforescencia de la muestra.
- Cambios en el índice de refracción debido a las altas concentraciones
- Cambios en el equilibrio químico como función de la concentración
- Radiación no monocromática, las desviaciones pueden ser minimizadas usando una parte uniforme del espectro de absorción como el máximo de absorción de banda.
- Desviación de la luz.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción general del diseño experimental

Obtención y preparación de la muestra. La muestra de cabeza de camarón se obtuvo de un establecimiento de mariscos de la localidad, para ser transportada al laboratorio LV-500 donde se elimina la humedad en una estufa de convección mecánica, después fue molido en un molino Willey de malla número 40, se guardó para su análisis en un frasco de plástico boca ancha con tapón de rosca. A una porción de 10 g de la harina se le determinó humedad en una balanza analítica Ohaus para determinar humedad.

Los experimentos a realizar para la selección del tamaño óptimo de la muestra para validar el método de análisis fue con cantidades variables; 0.5, 1.0 y 1.5g de muestra. Las muestras se sometieron a una digestión con una mezcla de ácidos en las siguientes proporciones: ácido nítrico-perclórico (5:1), ácido nítrico-perclórico (4:1), ácido nítrico-perclórico (3:1), ácido nítrico-perclórico (2:1), y ácido nítrico-

perclórico (1:1). Se sometieron a diferentes tiempos de digestión, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 horas.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la muestra para validar el método analítico en cuanto a tiempos de digestión, proporción de la mezcla de los ácidos digestores y mineralización.

3.2 Equipo instrumental

El instrumento utilizado fue el espectrómetro de absorción atómica SpectrAA 50/55 VARIAN, se calibró electrónicamente utilizando los blancos y controles apropiados, las lámparas utilizadas de cátodo hueco VARIAN. Se utilizó acetileno de Infra, S. A. de Cd. Obregón Son. Este instrumento es un equipo con procesador integrado ideales para aquellos laboratorios que necesitan un sistema con capacidades avanzadas pero fáciles de usar en los análisis de metales, minerales ó aplicaciones industriales.

3.3 Solución estándar

Solución estándar de cobre: se pesaron 0.500g de Cu en 20ml de solución de ácido nítrico, 1:1 y aforado a 500ml con agua desionizada.

Solución estándar de manganeso: se pesaron 0.500g de Cu en 20ml de solución de ácido nítrico, 1:1 y aforado a 500ml con agua desionizada.

Blanco utilizado: agua desionizada.

3.4 Preparación de la muestra por triplicado

Se pesaron por triplicado 0.5, 1.0 y 1.5 gramos de la harina de cabeza de camarón, se depositaron cada una de ellas en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad lavado con anterioridad con solución de ácido nítrico al 5 %, y se les añadieron 5 ml

de solución digestora ácida concentrada con las proporciones: $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (5:1), $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (4:1), $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (3:1), $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (2:1), $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:1). La duración de la digestión de las muestras fue hasta que cesó la evolución de gases nitrosos y la solución fuese clara. El tiempo de digestión fue tomado en cada muestra.

Características de las lámparas de cátodo hueco

Se tomaron en consideración los parámetros de la siguiente tabla

Tabla 2 longitudes de onda para cada elemento

Elemento	Longitud de onda (nm)	Flama
Cu	324.7	Aire-acetileno
Mn	279.5	Aire-acetileno

3.6 Materiales y reactivos

Material de vidrio Pyrex, matraces volumétricos de 100, 500 y 1000 ml de capacidad, pipetas mohr de 1, 5 y 10 ml de capacidad, se utilizó Balanza analítica marca SATORIUS Modelo CP225D para pesado de la muestra, Balanza analítica Ohaus para determinar humedad en la muestra de 10 g de capacidad, estufa de convección mecánica, marca Cole-Parmer Instrument Company de 120 voltios y 800 watts, Parrilla eléctrica de plato caliente Termolyne HP2625R control de temperatura desde cero a 219 °C. Agua desionizada (5-6 $\mu\text{mhos/cm}$) obtenida de la Distribuidora y Mantenimiento del Noroeste de Cd. Obregón, Sonora; ácido nítrico al 69-71% %, obtenido de Baker y ácido perclórico al 69-72 % obtenido de J. Baker, ambos de grado reactivo analítico. Cobre metálico (Cu) 20-30 mallas de J. T. Baker y Manganese (Mn) de Sulfato de Manganese ACS R. A. de J. T. Baker.

En general el material de vidrio fue tratado anticipadamente con solución de ácido Nítrico al 5 % para eliminar cualquier residuo catiónico que puede interferir con el proceso analítico.

3.5 Cálculos

Para seleccionar la muestra que mejor comportamiento tuvo en su procesamiento se analizaron los resultados visuales de la digestión ácida de cada una de las muestras, seleccionando aquella muestra que tuvo mejor tiempo de digestión, el extracto de digestión más claro, sin residuos y la proporción de ácidos mínima.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de la muestra.

Para la cantidad de muestra a utilizar en el instrumento espectrómetro de AA se realizaron tres tipos de muestras para la disolución (0.5, 1.0 y 1.5 g) y en tiempos de digestión (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 hr.) todas ellas disueltas en solución digestora ácida de proporciones variables (nitrato-perclórico concentrada). Se seleccionó la que en menor tiempo se homogenizó y contenía mas muestra que fueron las tres muestras con mayor cantidad de solución digestora ácida 5:1 para tener mejor resultado en lectura de absorbancia.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del diseño experimental para selección de la muestra y tratamiento que mejor comportamiento obtuvo; Con estos resultados se decidió que la muestra a utilizar para la validación del método de análisis instrumental fue la de 1.5 g empleando la solución digestora ácida en la proporción 5:1 y en un tiempo óptimo de digestión de 0.5 hrs.

Se pudo haber seleccionado las muestras de 0.5, 1 y 1.5 g con la mezcla digestora acida en la proporción de 5:1 y los tiempos de digestión desde 0.5 hasta 2.5 horas, en virtud de que la digestión fue aceptable para su análisis; pero se seleccionó la muestra de mayor cantidad debido a que los micronutrientes Cu y Mn se encuentran en cantidades del orden de partes por millón (ppm).

4.2 Precisión del método

Es necesario probar distintas tomas de lecturas de absorbancia en el instrumento para garantizar que el método esta bien calibrado y evitar errores en la toma de muestras. Se observó que en la cuantificación de Mn las lecturas de absorbancia no variaron mucho en seis repeticiones que se hicieron, se obtuvo un promedio de absorbancia de 0.050 (tabla 7) en la muestra de harina de cabeza de camarón; y a la otra muestra tuvo una adición estándar interna de 2 ppm en las muestras, se obtuvo un promedio de las lecturas de absorbancia de 0.088, correspondiendo a un porcentaje de recuperación de 90 es un valor aceptable según la AOAC (asociación oficial de químicos analíticos) en función de la concentración del analito en unidades de 10 ppm por lo cual el factor de recuperación del rango porcentual esta entre 80 y 110 por ciento. De igual manera se hizo para Cu las lecturas de absorbancia no variaron mucho en seis repeticiones se obtuvo un promedio de absorbancia de 0.153 (tabla 7) en la muestra de harina de cabeza,

Tabla 3. Diseño experimental para determinar el tiempo óptimo de digestión.

Relación en vol. De Solvente HNO ₃ /H ClO ₄	TIEMPOS DE DIGESTION DE LA MUESTRA, EN HORAS														
	0.5			1.0			1.5			2.0			2.5		
	0.5 g	0.1 g	1.5 g	0.5 g	0.1 g	1.5 g	0.5 g	0.1 g	1.5 g	0.5 g	0.1 g	1.5 g	0.5 g	0.1 g	1.5 g
5:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4:1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
3:1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
2:1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
1:1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++

Interpretación de resultados de dilución como:

+++ : Muy aceptable

+: no aceptable

++ : Aceptable

-: rechazo

De camarón; y a la otra muestra tuvo una adición estándar interna de 2 ppm en las muestras, se obtuvo un promedio de las lecturas de absorbancia de 0.315 (tabla 7), correspondiendo a un por ciento de recuperación de 90 es un valor aceptable es un valor aceptable según la AOAC (asociación oficial de químicos analíticos) en función de la concentración del analito en unidades de 10 ppm por lo cual el factor de recuperación del rango porcentual esta entre 80 y 110 por ciento. Se realizaron las curvas estándar de cada uno de los microelementos a analizarse, ya que son necesarios para comparar la cantidad de los microelementos obtenidos en las muestras, se obtuvieron las curvas estándares para Cu que están contenidas entre 0.019 y 0.921, las curvas para Cu (tabla 4 y figura 2), Mn (tabla 5 y figura 3) se observa que obtuvo una marcada línea de tendencia ya que presentaron valores de coeficiente de determinación (r^2) mayores a 0.995 con esto expresa la proporción de la variación total del método, ya que el valor máximo de la correlación es la unidad.

4.3 Curvas estándar

Tabla 4. Absorbancia para soluciones estándares de Mn

Concentración (ppm)	Absorbancia
1	0,019
2	0,038
3	0,063
4	0,089

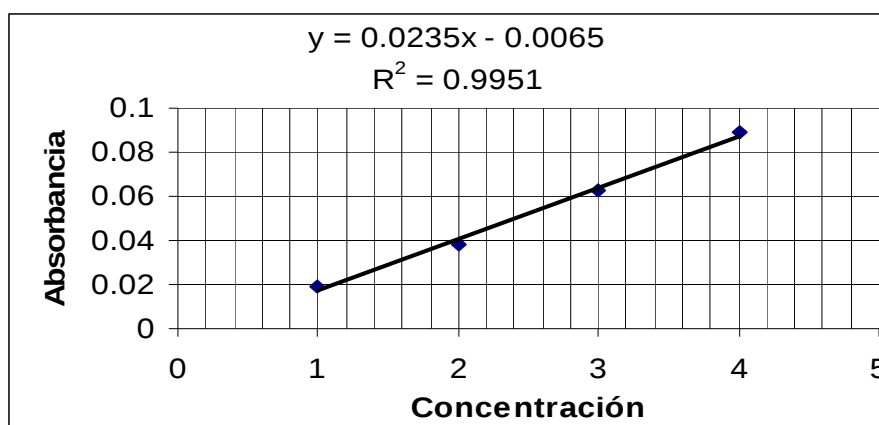


Fig. 2 Curva de calibración de soluciones estándares de manganes

Tabla 5. Absorbancia para soluciones estándares de Cu

Concentración (ppm)	Absorbancia
1	0,095
3	0,295
5	0,498
7	0,697
10	0,920

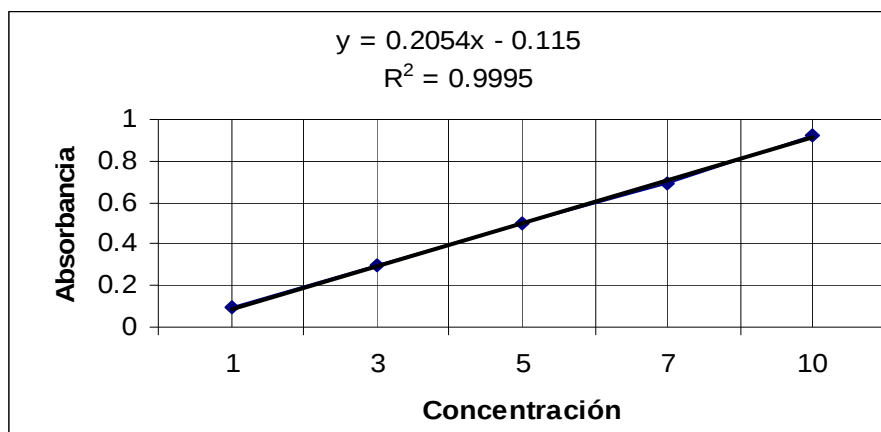


Fig. 3 Curva de calibración de soluciones estándares de cobre

El coeficiente de correlación para manganeso es 0.9975 y para cobre es 0.9976 el valor recomendable es ≥ 0.999 pero en caso de impurezas se acepta ≥ 0.990 según la asociación española de farmacéuticos de la industria; citado por Rosas (2005), presentando valores aceptables. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6 se enlistan los parámetros y el coeficiente de correlación de las curvas estándar de cada microelemento.

Tabla 6. Calibración y precisión del método para los diferentes microelementos analizados

Microelemento	Ecuación de calibración	r^2
Mn	$y = 0.0235x - 0.0065$	0.9951
Cu	$y = 0.2054x - 0.115$	0.9995

4.4 Recuperación del método

Como se pretendió valorar los resultados para dar un valor aceptable, se adicionó una cantidad conocida de la solución estándar de 0.1 ml a una muestra a una concentración de 2 ppm, los resultados se muestran en la tabla 7, en cual se puede observar que la recuperación para Mn y Cu es del 90 %; así mismo se da el resumen de los resultados de los parámetros de validación del método analítico de los elementos manganeso y cobre.

Tabla 7. Resumen de los cálculos de validación del método analítico

Resultados	Micronutrientes			
	Mn	Mn con adición estándar interna	Cu	Cu con adición estándar interna
Desviación Estándar	0,0007	0,0006	0,0075	0,0047
Coefficiente de variación	1.4	0.7	2,4011	3,0671
Coefficiente de correlación	0.9975	0.9975	0.9976	0.9976
Promedio del % de recuperación		90		90
Media en unidades de absorbancia	0,0500	0.0880	0,3153	0,1531
Concentración de los elementos en las muestras, en ppm	2.1276	3.9130	1.3052	3.1000

CONCLUSIÓN

Se presentó en este trabajo de investigación el método instrumental de espectroscopia de absorción atómica para el análisis cuantitativo de los micronutrientes cobre y manganeso presente en la harina de cabeza de camarón digerida con soluciones digestoras ácidas.

La validación del método se considera aceptable ya que se obtuvieron niveles de recuperación a 90% para manganeso y cobre; así como también una alta correlación en la linealidad de los estándares, se determinó de la misma manera precisión aceptable y una desviación estándar dentro de los rangos de aceptación para cobre de 0.0047 y para manganeso de 0.0007 , por lo tanto, las variables que intervienen en el proceso de análisis fueron analizadas correctamente para aplicarse el método rutinario de estos elementos en harinas de cabeza de camarón.

BIBLIOGRAFIA

CURTIS, Helena. 2000. Biología. Editorial panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 698-701

CHARLEY, H. (2001). Tecnología de alimentos. Limusa, Mexico, D:F.Mexico. pag 6003.

DAVID Havey. Mc. Fraw Hill. 2000. Modern Analytical Cehmistry. New York, USA. pp 412-418.

GOÖKOOJLU, N.; Yerlikaya, P. Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. *Food Chem.* 2003, 80, 495-498.

HASHMI, M. I.; Mustafa, S.; Tariq, S. A. Heavy metal concentrations in water and tiger prawn (*Penaeus monodon*) from growout farms in Sabah, North Borneo. *Food Chem.* 2002, 79, 151-156.

ISO/IEC 17025. 1999. NMX-EC-17025-IMNC. 2000. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A. C. México.

MARTINEZ Cruz Oliviert. 2005. Cuantificación de ácido láctico Durante el ensilaje de residuos de camarón por cromatografía líquida de alta resolución. ITSON, Departamento de biotecnología y ciencias alimentarias, Cd. Obregón Sonora México. p 23

MARTINEZ, Silvia, Azcon-Bieto, J. y Talon, M. 1999. Fisiología y bioquímica vegetal. 1ª ed. Ed Interamericana Mc Graw Hill. Madrid. p 581

MENDOZA L. Ana Gabriela. 2004. Validación de grasa y aceites en aguas residuales. ITSON. Departamento de biotecnología y ciencias alimentarias. Cd. Obregón Sonora, México.

NEILAND, A. E.; Soley, N.; Varley, J. B.; Whitmarh, D. J. Shrimp aquaculture: economic perspectives for policy development. *Mar. Policy* 2001, 25, 265-279.

RAY, P.M. (1980) La planta viviente. Ed. Continental. Sexta impresión México. P 129.

- ROSAS R. J. 2005. Análisis de aminoácidos libres en el residuo de cabeza de camarón fermentado por cromatografía líquida de alta resolución. ITSON. Departamento de Biotecnología y ciencias alimentarias, Cd. Obregón Sonora México. Pp 23-41
- SZEFER, P.; Domaga³a-Wieloszezewska, M.; Warzocha, J.; Garbacik- Weso³owska, A.; Ciesielski, T. Distribution and relationship of mercury, lead, cadmium, copper and zinc in perch (*Perca fluviatilis*) from the Pomeranian Bay and Szczecin Lagoon, southern Baltic. *Food Chem.* 2003, *81*, 73-83.
- SZEFER, P. *Metals, Metalloids and Radionuclides in the Baltic Sea Ecosystem*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002.
- TOBEY, James, Jason Clay, and Philippe Vergne. 1998. The Economic, Environmental and Social Impacts of Shrimp Farming in Latin America. Coastal Resources Center: University of Rhode Island.
- VARIAN. 2000. Manual de Operación. SpectrAA-50/55. Australia.

