

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Determinación de hierro y zinc en diferentes especies de pescados de la costa
ecuatoriana por espectrofotometría de absorción atómica de llama.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas con
mención en Química Analítica

GABRIELA SOFÍA BETANCOURT FLORES

Quito, 2017

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la candidata Gabriela Sofía Betancourt Flores ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

Mtr. Pablo Pozo

DIRECTOR

DEDICATORIA

A mi madre, tía y hermano, los tres pilares fundamentales en mi vida...

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quienes me ofrecieron el tiempo necesario y el apoyo incondicional en todo el transcurso de mi carrera, en especial, a mi amigo Ing. Xavier Navarro por ser parte importante en mi formación académica durante este periodo.

A mi hada madrina y ejemplo a seguir, Jacqueline Betancourt, quien ha hecho todos mis sueños realidad, entre ellos, haber estudiado en esta prestigiosa Universidad, en realidad no existen palabras de gratitud que abarquen todo lo que has hecho por mí. A mi madre Mónica, padre Fernando y no menos importante, mi hermano Isaac, ustedes han hecho de mi vida un recorrido de alegrías y momentos inolvidables, brindándome siempre su amor incondicional, simplemente, mi razón de vida.

A mis amigas, Doménica y Karla, por estar presentes en las buenas y en las malas, con ustedes he compartido tiempos increíbles que nunca olvidaré.

A todos quienes conforman la Escuela de Ciencias Químicas, compañeros y profesores, que cada día incentivan y refuerzan nuestros conocimientos, en especial al Mtr. Pozo quien me ha brindado su amistad y soporte. Finalmente, a Eliza Jara por su asesoramiento y colaboración, siendo quien me facilitó de las herramientas necesarias para la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I.....	6
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. NUTRICIÓN.....	6
1.1.1. NUTRIENTES.....	6
1.2. MINERALES.....	7
1.2.1. HIERRO.....	8
1.2.2. ZINC.....	10
1.3. PESCADO.....	11
1.3.2. PESCA EN EL ECUADOR.....	12
1.3.3. ESPECIES ANALIZADAS.....	13
1.4. ANÁLISIS DE MINERALES.....	22
1.5. ESTUDIOS RELACIONADOS.....	25
CAPÍTULO II.....	28
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1. MUESTREO.....	28

2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	30
2.3. MÉTODO DE ANÁLISIS	30
2.4. VALIDACIÓN PARCIAL	34
CAPÍTULO III	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1. VALIDACIÓN PARCIAL	45
3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	52
3.3 COMPARACION ENTRE ESPECIES	59
CAPÍTULO IV.....	63
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
4.1 CONCLUSIONES	63
4.2 RECOMENDACIONES	64
CAPÍTULO V	66
5. BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO II

Tabla 2. 1. Concentraciones estándar de curvas de calibración para hierro y zinc	33
Tabla 2. 2. Condiciones utilizadas de cada metal en el espectrofotómetro de absorción atómica	33
Tabla 2. 3. Concentraciones reportadas de hierro y zinc en filete de diferentes pescados en estudios internacionales (mg/kg)	38
Tabla 2. 4. Fortificaciones a nivel bajo, medio y alto para hierro y zinc usadas en el análisis de recuperación.....	39
Tabla 2. 5. Recuperación estimada en porcentaje de acuerdo a la concentración esperada de analito [32].....	39

CAPÍTULO III

Tabla 3. 1. Resultados de blancos estándar, LOD y LOQ obtenidos para hierro y zinc	45
Tabla 3. 2. Resultados obtenidos del parámetro linealidad	49
Tabla 3. 3. Resultados de las fortificaciones para hierro.....	49
Tabla 3. 4. Resultados de las fortificaciones para zinc.....	50
Tabla 3. 5. Resultados de blanco matriz para hierro y zinc.....	51
Tabla 3. 6. Resultados de reproducibilidad para hierro y zinc	52
Tabla 3. 7. Resultados de la concentración de hierro en las veinte y una especies de pescado, con sus respectivos análisis estadísticos.	53
Tabla 3. 8. Resultados de la concentración de zinc en las veinte y una especies de pescado, con sus respectivos análisis estadísticos.	55
Tabla 3. 9. Resultados prueba de comparación múltiple para hierro	59
Tabla 3. 10. Resultados prueba de comparación múltiple para zinc.....	60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. 1. Grupo hemo de la hemoglobina 12.....	8
Figura 1. 2. Partes externas de un pez 19.....	11
Figura 1. 3. Albacora (<i>Thunnus albacares</i>) [21].....	13
Figura 1. 4. Atún (<i>Thunnus alalunga</i>) [21].....	13
Figura 1. 5. Bagre (<i>Bagre Panamensis</i>) [21].....	14
Figura 1. 6. Bandera (<i>Istiophorus platypterus</i>) [21].....	14
Figura 1. 7. Bonito Sierra (<i>Serda orientalis</i>) [21].....	15
Figura 1. 8. Cabezudo (<i>Caulolatilus affinis</i>) [21].....	15
Figura 1. 9. Carita (<i>Selene Peruviana</i>) [21].....	16
Figura 1. 10. Camotillo (<i>Serranus psittacinus</i>) [21].....	16
Figura 1. 11. Cherna (<i>Mycteroperca xenarcha</i>) [21].....	16
Figura 1. 12. Corvina (<i>Cynoscion stolzmanni</i>) [21].....	17
Figura 1. 13. Dorado común (<i>Coryphanea hippurus</i>) [21].....	17
Figura 1. 15. Guaba (<i>Fistularia corneta</i>) [21].....	18
Figura 1. 16. Lechuza (<i>Scorpaena histrio</i>) [21].....	18
Figura 1. 17. Lisa (<i>Mugil cephalus</i>) [21].....	19
Figura 1. 18. Murico (<i>Epinephelus labriformis</i>) [21].....	19
Figura 1. 19. Pargo (<i>Lutjabus peru</i>) [21].....	19
Figura 1. 20. Perela (<i>Paralabrax loro</i>) [21].....	20
Figura 1. 21. Picudo (<i>Sphyraena idiaestes</i>) [21].....	20
Figura 1. 22. Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) [21].....	21
Figura 1. 23. Tiburón (<i>Carcharhinus falciformis</i>) [21].....	21
Figura 1. 24. Wahoo (<i>Acanthocybium solandri</i>) [21].....	22
Figura 1.25. Espectrofotómetro de absorción atómica de llama con un diseño de haz sencillo [24].....	25

CAPÍTULO III

Figura 3. 1. Curva de hierro obtenida en la semana 1.....	47
Figura 3. 2. Curva de hierro obtenida en la semana 2.....	47

Figura 3. 3. Curva de hierro obtenida en la semana 3	47
Figura 3. 4. Curva de zinc obtenida en la semana 1	48
Figura 3. 5. Curva de zinc obtenida en la semana 2	48
Figura 3. 6. Curva de zinc obtenida en la semana 3	48
Figura 3. 7. Gráfico de dispersión para hierro	61
Figura 3. 8. Gráfico de dispersión para zinc	62

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: RESULTADOS COMPARACIÓN INTERESPECIES	72
ANEXO 2: MÉTODO AOAC UTILIZADO	79
ANEXO 3: CÁLCULOS DE RECUPERACIÓN PARA HIERRO Y ZINC	83
ANEXO 4: CERTIFICADOS DE ESTÁNDARES UTILIZADOS	85

RESUMEN

Se analizaron las concentraciones de zinc y hierro en veinte y una especies de pescados marinos de la costa ecuatoriana, mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica de llama previa una digestión asistida por microondas, con el fin de evaluar el valor nutricional del pescado y establecerlo como fuente alternativa a la carne roja. Se utilizó como referencia el método estandarizado de la AOAC (Association of Analytical Communities, siglas en inglés) 999.10, asegurando la confiabilidad de los resultados al estimar previamente parámetros de desempeño, como: límites de detección y cuantificación, linealidad, exactitud y precisión. Además, se realizó un análisis estadístico para identificar las diferencias significativas entre las medias y varianzas de los datos obtenidos de las diversas especies de pescados.

Los resultados conseguidos en la validación parcial, son satisfactorios al cumplir con los criterios de aceptabilidad establecidos, considerando así al método adecuado para el análisis propuesto. Dentro de las muestras, se determinó que el atún (*Thunnus alalunga*) es la especie con mayor concentración de hierro, igual a 5,31 mg/100g de alimento, mientras que, la guaba (*Fistularia corneta*) presenta la mayor concentración de zinc, igual a 2,37 mg/100g, siendo estos los pescados que poseen un alto valor nutricional, dado a su valioso contenido de hierro y zinc.

Gracias al análisis estadístico se determinó que otras especies pueden utilizarse indistintamente con el mismo nivel de beneficio, como es el caso del atún y la albacora con su contenido en hierro, y la guaba con la albacora y el bagre en zinc. A su vez, al comparar los resultados obtenidos con la carne roja, son valores muy similares, lo que

convierte al pescado en una fuente nutricional óptima de consumo y de alto valor biológico para la salud humana.

Palabras claves: Hierro, zinc, nutrición, pescados marinos ecuatorianos.

ABSTRACT

Zinc and Iron content in twenty-one sea fish species from Ecuadorian Coast was determined by flame atomic-absorption spectrometry, in order to evaluate the fish nutritional content and its potential as an alternative food source to meat. 999.10 AOAC (Association of Analytical Communities) Standard Method was used as reference and a partial validation was performed to assure reliable data; estimated parameter were: detection and quantification limits, linearity, accuracy and precision. Besides, statistical analysis was executed through software, as a way to identify significant gaps between averages and standard deviations from obtained data.

Partial validation showed that data are satisfactory, as all acceptability criteria were met. It was determined that tuna (*Thunnus alalunga*) has the highest iron concentration (5.31 mg/100 g), while guaba (*Fistularia corneta*) has the highest zinc concentration (2.37 mg/100 g). Therefore, among all analyzed species, tuna and guaba, are the ones with higher nutritional value, considering their iron and zinc concentration respectively.

Based on statistical analysis, it was determined that some sea fish species can be used indistinctly with the same nutritional benefit, such as tuna or albacora, related to their iron level; and guaba, albacora and catfish related to their zinc level. At the same time, comparing obtained data with red meat, fish values are quite similar, what means that fish is a very good nutritional source, besides with high biological level for human health.

Keywords: Iron, zinc, nutrition, Ecuadorian sea fishes.

INTRODUCCIÓN

El hierro y el zinc son dos minerales esenciales de vital importancia que garantizan el buen funcionamiento del organismo, dado a que desempeñan gran cantidad de funciones fisiológicas e implicaciones bioquímicas dentro del cuerpo humano [1].

Cada uno de estos elementos presentan una cantidad adecuada que el organismo requiere a diario, sin embargo, en el caso de poseer una concentración menor a la recomendada, se manifiestan síntomas carenciales que podrían acarrear graves consecuencias para la salud, debido principalmente a que se reduce la inmunidad, aumentando la vulnerabilidad a las enfermedades y alterando el desarrollo físico y mental [2].

De tal manera, se conoce que la mayoría de los minerales se encuentran distribuidos ampliamente entre todos los alimentos y con una dieta balanceada, combinada con el ejercicio físico regular, se aportará la cantidad suficiente y necesaria de ellos. En general, se conoce que los alimentos de origen animal, son más ricos en hierro y zinc, siendo las carnes rojas y el pescado los principales ejemplares dentro de este grupo. Sin embargo, la carne a pesar de ofrecer una elevada cantidad de nutrientes y minerales, presenta grandes concentraciones de grasas saturadas que conllevan a un consecuente incremento de enfermedades cardiovasculares [3,4].

Por otra parte, el pescado, a diferencia de la carne aporta con grandes beneficios nutricionales, al contener: proteínas, vitaminas, minerales y ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-3, que tienen una incidencia positiva en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares; además se caracteriza

por ser un alimento de fácil digestión, estas características tienen gran importancia, ya que el pescado constituye una alternativa válida al consumo elevado de carnes ricas en grasa saturadas, lo que lo convierte en una fuente alimenticia fundamental para el ser humano y un objetivo importante de análisis a nivel nutricional [4,5].

Dentro del Ecuador el consumo de pescado es masivo, dado a que es una de las principales industrias de comercio y exportación del país, además de contar con un mercado suficiente y variado, con una disponibilidad de casi todas las especies en el transcurso del año, principalmente en la costa ecuatoriana [5].

De esta manera, analizar la concentración de zinc y hierro en diferentes especies de pescados marinos de mayor consumo en Ecuador, proveerá de datos necesarios para evaluar el aporte nutritivo que éstos ofrecen a la población.

Para exponer el contenido de este trabajo se ha organizado la información en 4 capítulos, siendo el primero el que contextualiza el desarrollo experimental presentado en el Capítulo 2. A continuación se detallan los resultados alcanzados y posteriormente las conclusiones que derivan de ello.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. NUTRICIÓN

La nutrición se define como el conjunto de procesos fisiológicos por los cuales el organismo recibe, transforma y utiliza las sustancias químicas contenidas en los alimentos, en relación con las necesidades dietéticas del organismo. Es un proceso involuntario e inconsciente que depende de procesos corporales y metabólicos como: la digestión, la absorción y el transporte de los nutrientes hasta los tejidos [6].

1.1.1. NUTRIENTES

Son las sustancias químicas presentes en los alimentos, gran parte de ellas esenciales, ya que no pueden ser sintetizadas por el cuerpo humano en las cantidades adecuadas, a pesar de ser necesarios para el crecimiento, reparación y mantenimiento del mismo. Según su concentración en el alimento, se dividen en macro y micronutrientes [7].

- **MACRONUTRIENTES**

Son aquellos nutrientes que ocupan la mayor proporción de los alimentos, dentro de este grupo se encuentran las proteínas, carbohidratos y lípidos o grasas, utilizados principalmente por los tejidos, tanto con fines energéticos como estructurales [6].

- **MICRONUTRIENTES**

Son nutrientes que están presentes en pequeñas proporciones dentro de los alimentos, llegando a encontrarse en cantidades de miligramos y microgramos, sin embargo, son

imprescindibles para la subsistencia del ser humano. Este grupo se constituye por las vitaminas y los minerales, cuya función principal es facilitar y controlar las funciones bioquímicas en el interior de los seres vivos [6].

1.2. MINERALES

Son los elementos inorgánicos de la alimentación, necesarios para la elaboración de tejidos, la síntesis de hormonas y están presentes en la mayor parte de las reacciones químicas en las que intervienen las enzimas [6].

- MINERALES ESENCIALES

Se conoce que alrededor de 27 de los elementos químicos existentes en la corteza terrestre son esenciales para la vida, ya que son minerales imprescindibles para la actividad de las células, necesarios para controlar las funciones de diversos tejidos; acorde a su concentración en el cuerpo se clasifican en: macro y microelementos [1]:

- MACROELEMENTOS

Son aquellos elementos que se requieren en mayor cantidad en el cuerpo y se miden en concentración de gramos, entre ellos tenemos: al calcio (Ca), sodio (Na), fósforo (P) y azufre (S) [8].

- MICROELEMENTOS

En éste grupo encontramos a los elementos que se necesitan en menor cantidad, y se miden en miligramos, como ejemplares tenemos: al hierro (Fe), zinc (Zn), flúor (F) y yodo (I) [8].

1.2.1. HIERRO

El hierro es uno de los principales componentes de la sangre, al formar parte de la estructura de la hemoglobina y mioglobina, proteínas que transportan oxígeno desde los pulmones hasta las células más remotas del organismo; a su vez, participa en procesos de obtención de energía al encontrarse en enzimas, cuya función principal se observa en la producción de ATP (Adenosín trifosfato); actúa durante actividades de defensa del organismo y en sistemas neurocerebrales [9]. La cantidad de hierro recomendado varía de 8-18 mg/día en adultos, 10 mg/día en niños y 27 mg/día en mujeres embarazadas [10].

De acuerdo a la forma química en el alimento existen dos tipos de hierro: el hemo y el no hemo. Al hierro hemo se lo denomina así porque constituye la estructura del grupo hemo en estado ferroso (Fe^{2+}), presente en las moléculas de hemoglobina, mioglobina y algunas enzimas, en este estado, el hierro se caracteriza porque se absorbe con mayor eficiencia dentro del organismo, llegando hasta un 20-35% de su absorción, el cual se encuentra solo en alimentos de origen animal, tales como: carne, pollo y pescado [9,11].

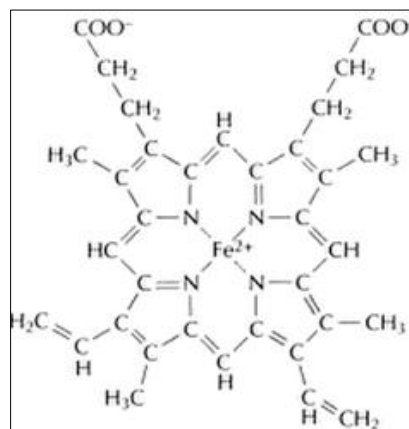


Figura 1. 1. Grupo hemo de la hemoglobina [12]

Por otro lado, el hierro no hemo se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}), formando parte de componentes que no presentan grupo hemo, como diversas enzimas; en este caso solo un 5-10% se absorbe por el organismo, debido a que el intestino delgado es capaz de absorber las sales ferrosas más no las férricas, de esta manera el estado férrico debe ser reducido a ferroso para su mayor absorción. Tal reducción se logra dentro del estómago y en los intestinos, gracias al bajo pH gástrico, la acción de enzimas ferroreductasas y la intervención de una serie de factores que hacen que el hierro se absorba en mayor o menor proporción, como: la presencia de vitamina C y la de taninos en el café, respectivamente. El hierro no hemo se presenta en fuentes vegetales: legumbres y cereales [9,11,13].

La consecuencia fisiológica más evidente en la disminución de los niveles de hierro en el cuerpo humano, es la conocida anemia, que se produce cuando todas las reservas corporales de dicho elemento se agotan, acarreado una limitación en el aporte de oxígeno a los músculos, manifestándose con el deterioro de la función muscular, limitación de capacidad de esfuerzo, disminución de la concentración y reducción en importante escala de los diferentes procesos metabólicos [14].

La falta de hierro, sin presencia de anemia o asociada con ella, es una de las deficiencias más significativas encontradas en atletas, personas de avanzada edad y en el género femenino, originado por diferentes factores como: disminución de su absorción a nivel intestinal, sudoración excesiva, aumento de su pérdida en mujeres por efecto de la menstruación, embarazo y lactancia; sin embargo, el principal motivo es puramente dietético, debido a ingestas inadecuadas [14,15].

1.2.2. ZINC

El zinc forma parte de más de un centenar de reacciones metabólicas en el organismo, al encontrarse acoplado a proteínas, muchas de ellas enzimáticas, como las polimerasas que intervienen en la síntesis de ADN y ARN, convirtiéndolo así en un regulador de la expresión genética. Además, desempeña un papel importante como estabilizador de membranas celulares y citoplasmáticas, desarrolla las sensaciones de gusto y olfato, incrementa la defensa inmune, la maduración sexual y favorece el desarrollo del crecimiento [16]. La dosis recomendada de zinc para adultos oscila entre los 10-12 mg/día, niños 5-8 mg/día y mujeres embarazadas de 12 mg/día [17].

La absorción del zinc en el organismo, varía entre un 5-40%, y depende meramente de factores nutricionales, ya que no existen reservas sustanciales de zinc en el organismo, resultando esencial una adecuada ingesta diaria de éste elemento que aporte con las concentraciones apropiadas dentro de los requerimientos dietéticos. En general, los alimentos de origen animal son más ricos en zinc que los vegetales, incluso se conoce que la proteína animal aumenta su absorción, solubilizando el zinc en los aminoácidos [16].

La deficiencia de zinc perjudica principalmente a la función inmunitaria, originando un trastorno del crecimiento con una baja síntesis de ADN, por otra parte, provoca alteraciones cutáneas, mala cicatrización, disminución del apetito, de la función respiratoria y la fuerza. Este déficit es frecuente en niños, lactantes y personas de avanzada edad [7].

1.3. PESCADO

La denominación genérica de “pescado” comprende a los peces marinos y de agua dulce, frescos o conservados por distintos procedimientos. Siendo los peces animales que viven en el agua dulce o salada, generalmente de forma fusiforme cubiertos de escamas; son vertebrados, cuya respiración es branquial, dotados de aletas para realizar movimientos proporcionados por sus masas musculares. La principal parte comestible del pescado está constituida por los músculos corporales de mayor tamaño, y en menor cantidad, la piel y otros órganos como el hígado, aptos también para el consumo humano [18].

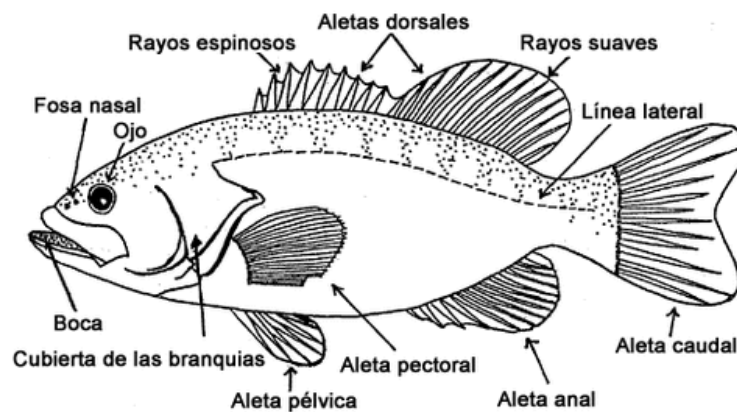


Figura 1. 2. Partes externas de un pez [19]

Por años, la *American Heart Association* ha recomendado la ingesta promedio de dos a tres pescados por semana, esto debido a las grandes ventajas que ofrece su consumo, entre ellos [20]:

- Poseen un elevado porcentaje de proteínas (15-27%) de muy alta digestibilidad y valor biológico, es decir, proteínas que contienen todos los aminoácidos esenciales y en la proporción adecuada.

- Son una fuente importante de minerales esenciales para la actividad vital como: el fósforo, calcio, hierro, potasio y yodo.
- Se puede utilizar el pescado blanco (contenido graso < 2%) para suavizar el contenido calórico de la dieta, y el pescado azul (contenido graso entre 8-15%) para aportar ácidos grasos poliinsaturados que permiten regular ciertos factores relacionados con las enfermedades cardiovasculares.
- Son ricos en vitaminas del grupo B como: B₁, B₂, B₃ y B₁₂; vitaminas liposolubles entre las que destacan la vitamina A, D y en menor proporción la E, presentes principalmente en el hígado de los pescados blancos y en la carne de los azules.
- Contiene ácidos grasos poliinsaturados en cantidades comprendidas entre un 25-45%, entre ellos se encuentran: el ácido linoleico, de la familia omega-6, y los ácidos EPA (eicosapentanoico, siglas en inglés) y DHA (docosahexanoico, siglas en inglés), de la familia omega-3. También contiene ácidos grasos monoinsaturados y en menor proporción, saturados.

1.3.2. PESCA EN EL ECUADOR

En el Ecuador la actividad pesquera se ha incrementado marcadamente en las dos últimas décadas, debido no solo a la creciente demanda interna, sino también a los recursos económicos que genera como consecuencia de las exportaciones y las diferentes fuentes alternativas de trabajo [21].

En el Ecuador la flota pesquera está formada principalmente por barcos “atuneros”, además de una gran cantidad de embarcaciones menores, cuyos principales productos son peces de aguas poco profundas (corvinas, pargos, etc.). La mayoría de las

actividades pesqueras ecuatorianas se desarrollan en la zona costera, entre los principales puertos tenemos: Esmeraldas, Manta, Santa Rosa, Bolívar, entre otros [21].

1.3.3. ESPECIES ANALIZADAS

- **Albacora (*Thunnus albacares*):**

Presenta un cuerpo fusiforme, alargado y redondeado. El dorso es azul metálico y vientre con visos amarillos a plateados, aleta dorsal y anal amarillentas. Talla máxima de 120 cm de longitud total. Es una especie oceánica que vive en agua de hasta 100 m de profundidad y temperatura entre 18 y 31° C. Se encuentra en el Pacífico oriental desde los Estados Unidos hasta el norte de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].

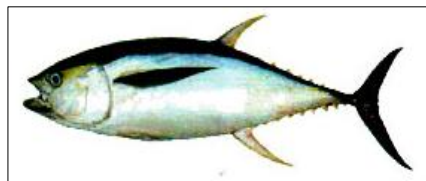


Figura 1. 3. Albacora (*Thunnus albacares*) [21]

- **Atún (*Thunnus alalunga*):**

Presenta un cuerpo fusiforme y alargado. Se caracteriza por la presencia de dos aletas dorsales bien separadas. Son ejemplares grandes de dorso azul metálico, vientre y aletas amarillentas. Talla máxima de 120 cm de longitud total. Es una especie oceánica que vive en aguas de hasta unos 100 m de profundidad. Se encuentra en las áreas del Pacífico Oriental desde los Estados Unidos hasta el norte de Perú [21].

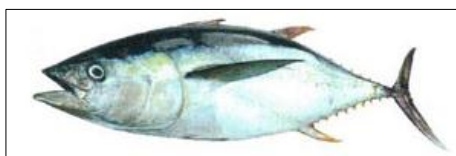


Figura 1. 4 Atún (*Thunnus alalunga*) [21]

- **Bagre (*Bagre Panamensis*):**

Presenta un cuerpo robusto y estrecho. Boca con labios carnosos y barbillas sensoriales maxilares. Posee un dorso azulado a café oliva, con reflejos dorados. Vientre blanco a plateado y aletas oscuras. Talla máxima de 50 cm de longitud total. Se encuentra en aguas costeras, de frecuencia común hasta 60 m de profundidad. Habita en las áreas del Pacífico Oriental desde los Estados Unidos hasta el norte de Perú [21].

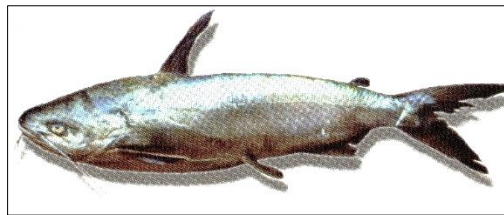


Figura 1. 5 Bagre (*Bagre Panamensis*) [21]

- **Bandera (*Istiophorus platypterus*):**

Presenta un cuerpo alargado y comprimido. Mandíbula superior prolongada en un pico largo. Dos aletas dorsales, la primera con una membrana azul negruzca y manchas oscuras. Aletas pélvicas delgadas. Dorso oscuro y vientre claro plateado; cuerpo con unas 20 franjas verticales azuladas. Talla máxima de 320 cm de longitud total. Especie oceánica que habita en el Pacífico oriental desde los Estados Unidos hasta Chile [21].

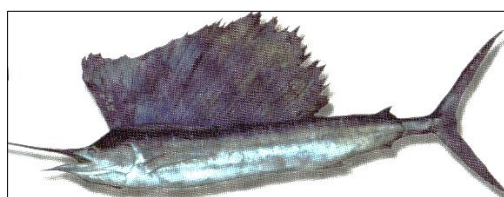


Figura 1. 6. Bandera (*Istiophorus platypterus*) [21]

- **Bonito Sierra (*Serda orientalis*):**

Presenta un cuerpo fusiforme, alargado y redondeado. Boca grande con el supramaxilar angosto. El dorso es azulado púrpura, partes bajas del vientre blanco plateado con

franjas oscuras en toda la región dorsal. Talla máxima de 100 cm de longitud total. Especie costera de aguas con temperaturas entre 13 y 23 ° C. Se localiza en el Pacífico oriental desde México hasta el norte de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].

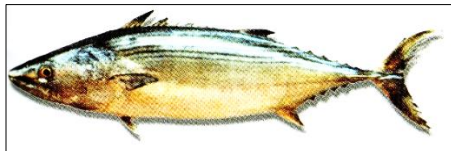


Figura 1. 7. Bonito Sierra (*Serda orientalis*) [21]

- **Cabezudo (*Caulolatilus affinis*):**

Presenta un cuerpo alargado y robusto. Se caracteriza por su cabeza grande y chata. Aletas largas y continuas. Un dorso verde aceitunado, una franja amarilla frente al ojo y una mancha negra sobre la axila de las aletas pectorales. Talla máxima de 60 cm de longitud total. Especie de aguas costeras de frecuencia abundante hasta 185 m de profundidad, se localiza en el Pacífico oriental, desde México hasta Perú [21].



Figura 1. 8. Cabezudo (*Caulolatilus affinis*) [21]

- **Carita (*Selene Peruviana*):**

Presenta un cuerpo corto, alto y comprimido, superficialmente desnudo. Posee una coloración plateado a dorado, con reflejos azul metálicos. Talla máxima de 40 cm de longitud total. Especie de aguas costeras de hasta 50 m de profundidad, con frecuencia abundante. Se distribuye en el Pacífico oriental desde los Estados Unidos hasta el centro de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].

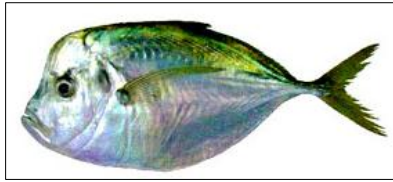


Figura 1. 9. Carita (*Selene Peruviana*) [21]

- **Camotillo (*Serranus psittacinus*):**

Presenta un cuerpo alargado, moderadamente comprimido, de coloración marrón con una banda media lateral negra, vientre amarillento con una hilera de manchas rojas. Talla máxima de 17 cm de longitud total. Especie de aguas costeras de frecuencia común. Se encuentra en arrecifes aislados de 60 m de profundidad. Su distribución se expande en el Pacífico oriental desde México hasta el norte de Perú [21].



Figura 1. 10. Camotillo (*Serranus psittacinus*) [21]

- **Cherna (*Mycteroperca xenarcha*):**

Presenta el cuerpo robusto y algo comprimido, caracterizado por su boca prominente. Puede presentar dos patrones de coloración: el primero de fondo grisáceo y manchas oscuras. El segundo, marrón uniforme con aletas más oscuras y bordeadas de blanco. Es una especie de aguas costeras común hasta 60 m de profundidad. Se localiza en el Pacífico oriental desde los Estados Unidos hasta el centro de Perú [21].



Figura 1. 11. Cherna (*Mycteroperca xenarcha*) [21]

- **Corvina (*Cynoscion stolzmanni*):**

Presenta un cuerpo alargado y poco comprimido. Boca grande y oblicua, mandíbula inferior prominente. Aletas dorsales no separadas, pectorales y anal cortas. Dorso azul metálico, vientre plateado, aletas anal y pélvica amarillentas. Talla máxima de 100 cm de longitud total. Especie que vive en aguas costeras y estuarios. Presente en el Pacífico oriental desde México hasta el Norte de Perú [21].



Figura 1. 12. Corvina (*Cynoscion stolzmanni*) [21]

- **Dorado (*Coryphanea hippurus*):**

Presenta un cuerpo alargado y comprimido. El perfil de la cabeza desarrolla una cresta ósea. Presenta una aleta dorsal a nivel del ojo que se extiende hasta la aleta caudal. Dorso verde azulado metálico brillante, flancos con reflejos dorados y numerosas manchas negras. Talla máxima de 180 cm de longitud total. Especie de frecuencia abundante en el Pacífico oriental desde los Estados Unidos hasta Chile, incluyendo las Islas Galápagos [21].



Figura 1. 13. Dorado común (*Coryphanea hippurus*) [21]

- **Guaba (*Fistularia corneta*):**

Especie de cuerpo largo y achatado. Boca pequeña, situada en el extremo de un hocico largo y tubular. Presenta un arco cerca del perfil dorsal, que descende hacia la parte media del cuerpo y continua hacia la aleta caudal. Posee un dorso rojo a naranja pardo, vientre claro y filamento caudal ceniciento. Especie de aguas costeras, común desde los

20 cm de profundidad, se lo encuentra en el Pacífico oriental desde México hasta el centro de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].

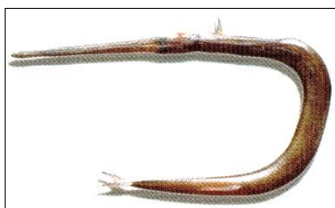


Figura 1. 14. Guaba (*Fistularia corneta*) [21]

- **Lechuza (*Scorpaena histrio*)**

Especie de cuerpo robusto y perfil dorsal arqueado. Cabeza deprimida. Cuerpo de fondo café rojizo, con manchas oscuras irregulares particularmente en la región dorsal y mancha característica encima de la pectoral. Talla máxima de 26 cm de longitud total. Especie costera que vive sobre fondos rocosos y arenosos a 150 cm de profundidad. Se localiza en el Pacífico oriental desde México hasta el centro de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].

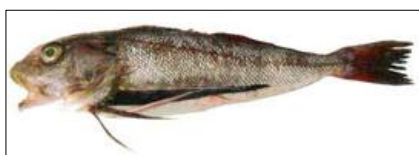


Figura 1. 15. Lechuza (*Scorpaena histrio*) [21]

- **Lisa (*Mugil cephalus*):**

Especie de cuerpo alargado y sub-cilíndrico. Cabeza ancha y achatada, con boca pequeña inferior. Presenta un dorso con tonalidad verde a café claro, vientre blanco y una serie de estrías oscuras horizontales. Talla máxima de 85 cm de longitud total. Vive en aguas costeras de hasta 120 cm de profundidad, y frecuencia común, se encuentra en el Pacífico Oriental desde los Estados Unidos hasta Chile [21].



Figura 1. 16. Lisa (*Mugil cephalus*) [21]

- **Murico (*Epinephelus labriformis*):**

Presenta un cuerpo alargado, moderadamente alto y comprimido en los laterales. Posee una aleta dorsal con 10 espinas, siendo la tercera y la cuarta las más grandes. Su cuerpo es verde aceitunado a pardo, con puntos y manchas blancas diseminadas. Talla máxima de 45 cm de longitud. Especie que vive sobre fondos rocosos hasta 30 m de profundidad en las áreas del Pacífico Oriental desde México hasta el norte de Perú [21].



Figura 1. 17. Murico (*Epinephelus labriformis*) [21]

- **Pargo (*Lutjabus peru*):**

Posee un cuerpo moderadamente alto y poco comprimido. Perfil de la cabeza poco empinado y convexo, con el hocico pronunciado. Coloración roja con reflejos plateados y aletas amarillentas. Talla máxima de 90 cm de longitud total. Especie que vive en arrecifes rocosos costeros, hasta unos 80 m de profundidad. Habita en el Pacífico oriental desde México hasta el centro de Perú [21].



Figura 1. 18. Pargo (*Lutjabus peru*) [21]

- **Perela (*Paralabrax loro*)**

Especie de boca grande y escamas ásperas. Cuerpo gris oscuro, con escamas de borde naranja y cabeza con manchas irregulares anaranjados, bordeadas de gris. Talla máxima de 55 cm de longitud total. Especie de aguas costeras, muy poco frecuente, que vive sobre fondos rocosos y arenosos. Se encuentra en el Pacífico oriental desde México hasta el Norte de Perú [21].



Figura 1. 19. Perela (*Paralabrax loro*) [21]

- **Picudo (*Sphyraena idiaestes*)**

Especie de cuerpo cilíndrico y prolongado, se reconoce fácilmente por sus ojos grandes, con hocico prolongado y puntiagudo. Cuerpo de coloración marrón a verde grisáceo uniforme, y vientre un poco pálido. Talla máxima de 75 cm de longitud total. Se encuentra en aguas costeras de profundidades hasta 100 m en el Pacífico oriental, desde el norte de Colombia hasta el norte de Perú [21].



Figura 1. 20. Picudo (*Sphyraena idiaestes*) [21]

- **Sierra (*Scomberomorus sierra*):**

Posee un cuerpo alargado y muy comprimido. Extremo posterior del maxilar expuesto, situado a nivel del borde posterior del ojo. Presenta flancos plateados, con numerosas manchas pardo amarillentas distribuidas en 2 o 3 hileras. Aleta anal blanca. Talla máxima de 95 cm de longitud total. Especie principalmente costera de frecuencia

abundante, se encuentra en el Pacífico oriental desde Estados Unidos hasta el Sur de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].



Figura 1. 21. Sierra (*Scomberomorus sierra*) [21]

- **Tiburón (*Carcharhinus falciformis*):**

Posee un cuerpo esbelto, fusiforme y alargado. Hocico moderadamente largo y estrechamente redondeado, cuya longitud es igual o poco menor que el ancho de la boca. Dorso gris oscuro, marrón a azul negruzco, vientre más claro. Talla máxima de 350 cm de longitud total. Especie oceánica y costera en las áreas del Pacífico Oriental desde México hasta el norte de Perú, incluyendo las islas Galápagos [21].

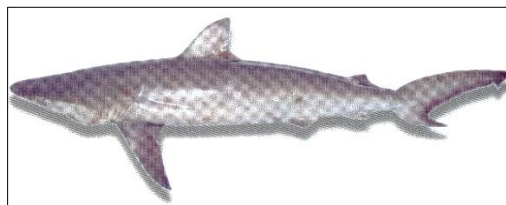


Figura 1. 22. Tiburón (*Carcharhinus falciformis*) [21]

- **Wahoo (*Acanthocybium solandri*):**

Especie de cuerpo muy alargado, fusiforme y moderadamente comprimido. Hocico de tamaño aproximadamente igual al resto de la cabeza. Dorso verde azulado, flancos plateados con unas 24 a 30 franjas azul cobalto, dispuestas transversalmente. Talla máxima de 210 cm de longitud total. Especie oceánica, se encuentra en el océano Pacífico oriental desde México al norte de Perú, incluyendo las Islas Galápagos [21].



Figura 1. 23. Wahoo (*Acanthocybium solandri*) [21]

1.4. ANÁLISIS DE MINERALES

La determinación cuantitativa de minerales es uno de los análisis más importantes dentro del ámbito nutricional, tanto para el conocimiento de su composición química, como para la evaluación del estado de salud de los individuos, según su alimentación. Lo que conlleva así, a la necesidad de revisar y completar la información existente sobre el contenido de elementos traza en los diversos alimentos [22].

Las técnicas analíticas disponibles para el análisis elemental, requieren de una mineralización previa de la muestra, para eliminar la materia orgánica y obtener la fracción mineral en forma analizable. El método frecuentemente utilizado, es la digestión, ya sea por vía seca o húmeda [22].

La digestión por vía seca se realiza en una mufla, donde las muestras son calentadas a 500-550°C en crisoles de porcelana; dicho método tiene la ventaja de no necesitar reactivos o sólo requerir una pequeña cantidad de ellos, el rendimiento de muestras es alto, con la utilización de instrumental simple, sin embargo, no es adecuada para elementos volátiles (por ejemplo: selenio y mercurio), los cuales se pierden durante la calcinación.

La digestión por vía húmeda en vasos abiertos involucra el calentamiento de las muestras en ácido, siendo los reactivos comúnmente utilizados: ácido nítrico, ácido clorhídrico y agua oxigenada. Sin embargo, estos sistemas poseen una serie de desventajas, al requerir largos períodos de calentamiento y grandes cantidades de ácidos, además, existe un alto riesgo de contaminación y pérdidas durante la mineralización [22].

Estas desventajas han llevado al desarrollo de sistemas cerrados, como es la digestión asistida por microondas, que consiste en el calentamiento de la muestra en vasos cerrados, transparentes a las microondas, donde la descomposición de la materia puede realizarse bajo temperatura y presión elevadas, reduciendo así el tiempo de digestión y gasto de reactivos, eliminando el riesgo de pérdida de elementos volátiles o contaminación aérea. Este procedimiento se utiliza para mineralizar muestras sólidas de las cuales se requiere obtener información elemental mediante técnicas espectroscópicas que requieren la muestra en estado líquido [23].

La espectrofotometría de absorción atómica de llama es una de las técnicas más comunes para el análisis elemental en alimentos; consiste en la descomposición de los compuestos presentes en una muestra en solución, en átomos en estado gaseoso, por medio de un proceso denominado atomización con llama, donde el aerosol de la muestra, obtenido previo a un proceso de nebulización, un flujo de gas oxidante y gas combustible se queman en un mechero de flujo laminar. Los átomos libres producidos absorben energía en forma de luz a una longitud de onda específica generada por una fuente externa de radiación, cuyo cátodo se encuentra constituido del metal a analizar.

Finalmente, la energía radiante producida se convierte en una señal eléctrica gracias al detector.

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración [24]. Siendo así, en una radiación monocromática la absorbancia directamente proporcional al camino óptico b a través del medio y la concentración c de la especie absorbente. Estas relaciones vienen dadas por la siguiente ecuación, la cual sirve como base para el análisis cuantitativo [25]:

$$A = axbxc \quad (1.1)$$

Donde:

A= Absorbancia

a= constante de proporcionalidad de cada sustancia, denominada absortividad

b= Espesor del medio que atraviesa la radiación (cm)

c= concentración de la sustancia que absorbe la luz (g/L)

El equipo de absorción atómica de llama consta de siete partes principales básicas, siendo estas: Zona de introducción de la muestra, atomizador de llama, fuente de radiación, selector de longitud de onda, detector, procesador de señal y dispositivo de lectura, tal como se muestra en la Figura 1.25

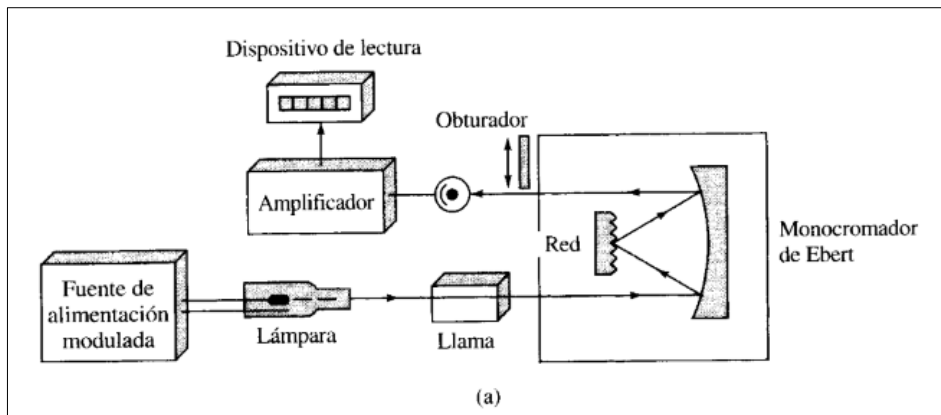


Figura 1.24. Espectrofotómetro de absorción atómica de llama con un diseño de haz sencillo [24].

1.5 ESTUDIOS RELACIONADOS

La determinación de la concentración de micronutrientes o elementos traza, tanto en pescados como en mariscos, es una de las investigaciones más desarrolladas a nivel mundial, debido a su importancia dentro del ámbito nutricional y ambiental en términos de contaminación.

La mayor parte de la literatura relacionada con los niveles de hierro y zinc en especies marinas, se publican principalmente en países europeos y asiáticos, cuyos resultados revelan una variedad de concentraciones sin precisión, esto debido a que la captación del elemento depende tanto de la fisiología de la especie, como el período del año en el cual fue muestreado. Sin embargo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (por sus siglas en inglés), gracias a un análisis realizado en una amplia variedad de especies, establece que la concentración de hierro y zinc en el filete de pescado en base seca, de manera general, oscila en un rango de 1 - 5.6 mg/100g y 0.23 – 2.1 mg/100g, respectivamente. Rangos sustanciales que sirven como guía de información y comparación para este tipo de investigaciones [26].

Dentro del país, el análisis cuantitativo de hierro y zinc es escaso, incluso en la propia Tabla de Alimentos Ecuatorianos no se ha actualizado esta información desde el año 1965, destacando a su vez que no se presentan todas las especies aquí detalladas. Mientras que, las investigaciones realizadas en peces a nivel nacional, recalcan el análisis de metales pesados, principalmente cadmio, plomo y mercurio, con énfasis en la contaminación ambiental, como es el estudio más reciente realizado por Villareal y Sánchez en 2016, en la especie dorado que se consume en la provincia de Manta, Ecuador, confirmando que los niveles de cadmio y mercurio en las muestras estudiadas se encuentran dentro de los límites permisibles de consumo e ingesta [27].

Por otra parte, países aledaños, como Perú y Venezuela, con salida al Pacífico Oriental, al contar con casi todas las especies de pescados presentes en el Ecuador, poseen publicaciones relevantes y correspondientes al tema de interés, los cuales permitirán ser referencia importante de comparación con los resultados obtenidos en este proyecto.

En general, se puede mencionar que, dentro de estas investigaciones, se han encontrado niveles de hierro y zinc dentro de los parámetros establecidos por la FAO y WHO, en una diversidad de especies. Como lo expone Jacinto en el 2007, cuyas especies marinas analizadas de la bahía de Huarmey en Perú, no superaron los estándares internacionales de contenido metálico, pero presentan una amplia variabilidad entre ellas, la cual estaría condicionada por una variedad de mecanismos internos y externos de cada organismo [28].

A su vez, en Venezuela, Márquez, durante el año 2008, demostró que, en varios tejidos musculares de peces, el hierro se encuentra desde 2,68- 30,27mg/kg, y en zinc igual a

8,71- 25,04 mg/kg, en este caso se detalla que los hábitos ecológicos de las diferentes especies, afectan en gran forma la captación del metal por el pez, por lo que la diferencia de concentración puede variar significativamente [29].

CAPÍTULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTREO

Las muestras de las diversas especies de pescados marinos fueron adquiridas en los meses de abril y junio de 2015, como parte del proyecto: L13259 “Determinación de perfil lipídico y contenido de ácidos grasos omega 3 y omega 6 de pescados marinos de mayor comercialización para consumo humano en el Ecuador como potenciales alimentos nutraceuticos”.

Los lugares de recolección de muestras fueron en mercados de alto flujo popular: "Mercado del Marisco" en Manta, y "Mercado Caraguay" en Guayaquil. Las especies de pescado se recolectaron mediante un muestro al azar, el mismo día de su pesca en cada mercado, procurando que no se repitieran. Así, en la ciudad de Manta se adquirieron 15 especies: sierra, dorado, guaba, albacora, cabezudo, picudo, carita, perela, lechuza, camotillo, corvina, bonito sierra, pargo, murico y atún, mientras que 6 especies de pescados se obtuvieron en la ciudad de Guayaquil: Lisa, Bagre, Wahoo, Cherna, Bandera y Tiburón.

En el sitio de muestreo, se obtuvieron las porciones musculares, libres de piel, de cada una de las especies, las cuales fueron almacenadas en fundas resellables e inmediatamente colocadas en hieleras plásticas para su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio las muestras se congelaron a -18°C . Los filetes congelados se homogenizaron en un procesador de alimentos (Oster) y se dividieron en porciones de

aproximadamente 2 g con film plástico, para facilitar su manipulación. Las muestras nuevamente se congelaron hasta el momento de su análisis.

El análisis de las muestras se realizó a partir del mes de julio del 2016; más de un año después de su muestreo. Sin embargo, al mantenerlas bajo congelación a -18°C y empacadas apropiadamente, se preservó su máxima calidad, tal como lo menciona el Departamento de Agricultura de los EE. UU. (USDA, por sus siglas en inglés), en su informe de Inocuidad de Alimentos, estableciendo que, la congelación, tanto para mariscos como carnes, los preserva por períodos extensos, ya que previene el crecimiento de microorganismos, reduce la actividad enzimática y las reacciones oxidativas, debido a la formación de cristales de hielo que modifican la disponibilidad del agua, evitando así que se favorezcan las reacciones deteriorativas, e incluso evitando la destrucción de sus nutrientes [30].

De igual manera, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), destaca que los pescados y mariscos congelados (-18°C o menor) se mantienen inocuos durante tiempo ilimitado, siendo solo su textura la que se modifica después de un año de congelación. La USDA expresa a su vez un tiempo de vida en almacenamiento congelado para filetes óptimo de 12 meses, al igual que lo detalla Gómez – Sánchez, en su informe técnico de alimentos, siendo éste un tiempo favorable más no limitante de la calidad del producto [31].

Cabe destacar a su vez, que al ser éste sólo un estudio preliminar, lo que se plantea identificar entre las especies analizadas, son aquellas que tengan potencial nutricional, más no evaluar la diferencia en composición debida a la época del año.

2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

EQUIPOS

- Mortero y pistilo de cerámica
- Estufa Binder ® FD 115

MATERIALES

- Muestras de los diferentes pescados
- Bolsas plásticas Ziplock ®

PROCEDIMIENTO

Las muestras homogenizadas que se mantuvieron bajo congelación para preservar su conservación, se descongelaron y secaron en estufa a 110°C por 24 horas. Una vez secas, se molieron en un mortero, con el fin de obtener un menor tamaño de partícula que facilite los análisis posteriores, recogiendo la muestra pulverizada en bolsas Ziplock rotuladas adecuadamente.

2.3. MÉTODO DE ANÁLISIS

Los análisis de hierro y zinc en las diferentes muestras de pescado se realizaron por el método de absorción atómica de llama, previa una digestión asistida con microondas; tomando como referencia el método estandarizado de la AOAC (Association of Analytical Communities, siglas en inglés) 999.10. (ver anexo 2). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, expresando la concentración obtenida en mg por cada 100 g de alimento (base seca), y en mg por cada Kg, este último por motivos de comparación con otras publicaciones.

EQUIPOS

- Microondas CEM® MARS6 230/60 910900
- Espectrómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer ® AAnalyst 400; Software WinLab32AA.
- Compresor de aire
- Balanza analítica Mettler Toledo ® ML 204, max 220 g, d=0,1 mg
- Sorbona LABCONCO CEX 120/ 011016 47
- Lámpara de hierro de cátodo hueco Perkin Elmer ®
- Lámpara de zinc de cátodo hueco Perkin Elmer ®

MATERIALES

- Tubos de teflón para microondas
- Balones de aforo de 100 mL
- Pipeta de volumen variable de 1000 µL
- Puntas para pipetas
- Pipetas pasteur
- Vasos de precipitación de 100 mL

REACTIVOS

- Agua desmineralizada (Conductividad < 0,067 µS/cm)
- Ácido nítrico concentrado Fisher Scientific grado traza de metales.
- Ácido nítrico 0,1 M.
- Peróxido de hidrógeno 30 %

- Estándar de hierro AccuStandard®, Inc. 1000 µg/mL
- Estándar de cinc AccuStandard®, Inc. 1000 µg/mL
- Acetileno

- **DIGESTIÓN DE LA MUESTRA**

Para eliminar la materia orgánica interferente de las muestras, se realizó una digestión asistida por microondas (sistema cerrado de alta presión CEM MARS 6), programado con los parámetros necesarios; donde se agregó 0,5g de la muestra seca en los tubos de teflón, junto con 5 mL de HNO₃ y 2 mL de H₂O₂ 30%, tal como se detalla en la AOAC (ver anexo 2). La solución resultante se llevó a volumen de 100mL con agua desmineralizada en balones de aforo y sin necesidad de realizar diluciones estas se leyeron directamente en el equipo de absorción atómica.

- **PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN**

A partir del estándar de 1000 µg/mL de cada metal, se preparó una solución madre de 50 mg/L, al añadir 5 mL del estándar con una pipeta y llevar a volumen de 100 mL con ácido nítrico 0,1 M en balones aforados. Luego, con pipetas automáticas, se tomó la cantidad exacta de solución madre para obtener seis estándares de concentración conocida para cada metal, como se indica en la Tabla 2.1., llevando a un volumen de 100 mL en balones con ácido nítrico 0,1 M. El blanco se realizó de la misma manera, sin agregar solución estándar.

Tabla 2. 1. Concentraciones estándar de curvas de calibración para hierro y zinc

Hierro (mg/L)	Zinc (mg/L)
0,125	0,050
0,250	0,100
0,500	0,250
0,750	0,500
1,000	0,750
1,500	1,000

- ANÁLISIS POR AAS

Para iniciar el análisis en el equipo de absorción atómica se siguieron los siguientes pasos consecutivos: se abrió la llave de paso del tanque de gas acetileno, se encendieron: el compresor de aire, el computador, el equipo de absorción atómica y el extractor de gases. Posteriormente, se abrieron las llaves de paso de los gases de las tuberías al equipo (Aire-acetileno).

Una vez encendido el equipo, mediante el software WinLab32AA se seleccionó el método del metal a analizar con las condiciones adecuadas, luego se encendió la lámpara, esperando que la energía de la misma se mantenga constante. Se abrieron las ventanas de control del equipo en el software, se encendió la llama del mechero y se analizaron: el blanco, la curva de calibración y las muestras. Terminadas las lecturas, se procedió apagar el equipo de la misma manera en la que se encendió, pero en reversa, adicionando que una vez apagada la llama y la lámpara, se cerraron las llaves de paso de las tuberías de los gases al equipo y se realizó su purga.

Tabla 2. 2. Condiciones utilizadas de cada metal en el espectrofotómetro de absorción atómica

Condición	Hierro (Fe)	Zinc (Zn)
Longitud de onda (nm)	248,33	213,86
Slit (Ancho/Altura) (nm/mm)	1,80/1,35	2,7/1,8
Relación Aire-Acetileno (mL/min)	10,00/2,50	10,00/2,50

La concentración mostrada por el equipo de absorción atómica se encuentra en unidades de mg/L, de tal manera, para obtener la concentración en mg por cada 100 gramos de alimento se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{R \times V \times 100}{M \times 1000} \quad (2.1)$$

Donde:

C= Concentración de mineral en mg/100g de muestra

R= Respuesta del equipo en mg/L

V= Volumen de aforo (mL)

M= peso de la muestra (g)

2.4. VALIDACIÓN PARCIAL

Según la norma ISO/IEC 17025:2005, "la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto".

En general, la validación es uno de los requisitos más importantes en la realización de cualquier análisis químico, ya que su procedimiento logra confirmar a través de estudios de laboratorio, las características de desempeño y limitaciones de un método seleccionado, siendo este apto o no para el uso indicado. De tal manera, en cualquier ensayo de laboratorio, dentro de su alcance, debe usar métodos y procedimientos apropiados, entre ellos preferentemente métodos normalizados [32, 33].

Los métodos normalizados son aquellos desarrollados por organizaciones reconocidas (AOAC International), publicados en normas (ISO, UNE, etc.) o laboratorios de

referencia y aceptados por el sector técnico en cuestión. Dentro del laboratorio, a pesar de usar un método normalizado es necesario confirmar, mediante validación, que éste puede aplicarse, teniendo en cuenta los medios disponibles del laboratorio y su capacidad para aplicar el método. La confirmación de un método normalizado se puede realizar mediante una validación parcial, sin necesidad de analizar todos los parámetros de una validación completa [34]. En este estudio se realizó la evaluación de los siguientes parámetros de desempeño:

- **LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)**

Se define como la magnitud mínima que puede detectarse, pero no cuantificarse con un valor exacto, a su vez considera la concentración más baja que se puede distinguir claramente a partir del cero. Para su determinación se realizó la medición de 10 blancos estándar con concentraciones cercanas o por debajo del límite de cuantificación esperable [34]. El límite de detección se obtiene mediante la siguiente fórmula [32]:

$$LOD = 3,29xS_{10} \quad (2.2)$$

Donde:

S_{10} : Desviación estándar de diez soluciones de concentración baja

- **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)**

Se define como la magnitud mínima que puede cuantificarse confiablemente por el instrumento con un nivel aceptable de exactitud. Para su determinación se realizó la medición de 10 blancos estándar con concentración cercana o por debajo del límite de cuantificación esperable [34]. El límite de cuantificación se obtiene mediante [32]:

$$LOQ = 10xS_{10} \quad (2.3)$$

Donde:

S_{10} : Desviación estándar de diez soluciones de concentración baja

- **LINEALIDAD**

Es la capacidad de un método, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito. La linealidad se determina mediante la realización de una curva de calibración, gráfico en el que se representa la señal del instrumento en función de la concentración de patrones con valores teóricos conocidos que cubran el intervalo de trabajo [32].

Criterios de aceptación

La linealidad se demuestra mediante el coeficiente de correlación (r^2), el cual indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores que puede alcanzar son -1 y 1 , siendo el valor máximo de 1 , una correlación perfecta entre X-Y con pendiente positiva. De esta manera, se acepta un r^2 con un valor igual o mayor que 0.995 . El coeficiente de correlación se obtuvo directamente al construir las gráficas de relación en el software Microsoft Excel.

- **EXACTITUD**

Expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia, sin embargo, cuando se aplica a un método de ensayo, la exactitud evalúa los efectos sistemáticos y aleatorios sobre los resultados individuales obtenidos, refiriéndose así a un estudio de combinación de veracidad y precisión [32]. En este caso se usó como patrón, un material de referencia interno, a partir de una matriz similar al de las muestras: la trucha, seleccionada al no encontrarse entre las muestras en estudio.

- **VERACIDAD**

Determina el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una serie

de resultados y un valor de referencia aceptado. Este parámetro se determina mediante el porcentaje de recuperación, el cual corresponde a la relación entre la concentración recuperada y la concentración real, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento del método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra [32]. El análisis realizó mediante fortificaciones en 3 niveles distintos, durante 3 semanas consecutivas; la recuperación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \left(\frac{C_e - C_0}{C_a} \right) \times 100 \quad (2.4)$$

Donde:

R: recuperación

C_e: es la concentración de analito de la muestra enriquecida.

C₀: es la concentración de analito medida en la muestra sin adicionar.

C_a: es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

Los tres niveles de fortificación se seleccionaron dentro de un rango de concentración teórico obtenido a partir de concentraciones de zinc y hierro en (mg/kg) reportados en referencias y estudios realizados recientemente en el filete de varios pescados, bajo la misma técnica de análisis utilizada, los rangos seleccionados para cada metal se muestran en la Tabla 2.3 a continuación:

Tabla 2. 3. Concentraciones reportadas de hierro y zinc en filete de diferentes pescados en estudios internacionales (mg/kg)

Locación geográfica	Año de muestreo	Fe	Zn	Referencia
Mar Árabe (Pakistán)	2013	0,685 - 3,098		[35]
Lagos Patagonia Norte (Argentina)	2010		12,00 - 52,00	[36]
Laguna Unare (Venezuela)	2003	7,76 - 30,27	8,71 - 25,04	[37]
Mar mediterráneo (Israel)	1998	2,17 - 28,20	2,53 - 23,30	[38]
Región de los Lagos (Chile)	2009	14,60 - 132,00	17,30 - 35,00	[39]
Región de los Lagos (Chile)	2010	12,00 - 48,00	17,00 - 32,00	[40]
Mar del sur de China	2012	2,51 - 22,99	2,34 - 6,88	[41]
Mar negro (Turquía)	2009	36,20 - 145,00	38,80 - 93,40	[42]
Cochin (India)	2006		0,66 - 39,15	[43]
	Rango general	0,685 - 145	0,66 - 93,40	

Dentro de cada rango general se eligió un nivel bajo, medio y alto, cuyas concentraciones de fortificación respectivas se determinaron usando la fórmula estipulada por la AOAC 999.10 (ver anexo 2) para el cálculo y evaluación de resultados.

$$C = \frac{a \times df \times 100}{m} \quad (2.5)$$

Donde:

C= Concentración del elemento en la muestra (mg/kg)

a= concentración en la solución (respuesta del equipo) (mg/L)

df= factor de dilución

m= peso de la muestra (g)

100= volumen de aforo de las soluciones (mL)

Las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 2.4 para hierro y zinc.

Tabla 2. 4. Fortificaciones a nivel bajo, medio y alto para hierro y zinc usadas en el análisis de recuperación

Elemento	Hierro		Zinc	
	C (mg/kg)	Fortificación (mg/L)	C (mg/kg)	Fortificación (mg/L)
Bajo	2,51	0,013	2,53	0,013
Medio	48,00	0,240	35,00	0,175
Alto	132,00	0,660	80,00	0,400

Criterio de aceptación

Según al valor obtenido del porcentaje de recuperación se puede utilizar los criterios de aceptación de la AOAC, de acuerdo a la concentración esperada del analito, comprobando si el %R obtenido se encuentra dentro del rango de %R teórico esperado, según lo mostrado en la Tabla 2.5.

Tabla 2. 5. Recuperación estimada en porcentaje de acuerdo a la concentración esperada de analito [32]

Unidad de analito	RSD (%)	Recuperación estimada (%)
100%	2,0	98-102
10%	2,8	98-102
1%	4,0	97-103
0,10%	5,7	95-105
100 ppm	8,0	90-107
10 ppm	11,3	80-110
1 ppm	16,0	80-110
100 ppb	22,6	80-110
10 ppb	32,0	60-115
1 ppb	45,3	40-120

- PRECISIÓN

La precisión es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí, por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los

resultados, habitualmente en términos de imprecisión como: desviación estándar y coeficiente de variación. A su vez este parámetro se establece en términos de repetibilidad y reproducibilidad [32].

- a) **Repetibilidad:** En este caso los resultados de análisis se obtienen con el mismo método, laboratorio, equipamiento y operador dentro de intervalos cortos de tiempo. Se determina registrando al menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones de un analito en un Material de Referencia interno, calculando la desviación Estándar (Sr) y el porcentaje de coeficiente de variación (CVr%) de los datos obtenidos [32].
- b) **Reproducibilidad:** Condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método, pero en condiciones diferentes, ya sea laboratorio, operadores, entre otros. Para determinar la reproducibilidad se sugiere realizar 3 mediciones de un Material de Referencia Interno por tres semanas, calcular la desviación estándar (SRi) y el coeficiente de variación (CVRI%) de los datos obtenidos [32].

Criterio de aceptación

El criterio de aceptación para la repetibilidad se hará en base al coeficiente de variación de Horwitz (CVh%) con fórmula:

$$CVh\% = 2^{(1-0,5) \times \log c} \quad (2.6)$$

Donde:

CVh%= Coeficiente de variación de Horwitz de repetibilidad

C= Concentración del analito expresado en potencia 10

Para el caso de la reproducibilidad el coeficiente de variación de Horwitz (CVh%) se divide para 3, como se menciona en la Guía Técnica de Chile, tomada como referencia para la validación del método, [26], obteniéndose así la fórmula:

$$CVhi\% = \frac{2 \times 2^{(1-0,5) \times \log c}}{3} \quad (2.7)$$

Donde:

CVhi%= Coeficiente de variación de Horwitz de reproducibilidad

C= Concentración del analito expresado en potencia 10

De esta manera en la repetibilidad, el CVr% obtenido deberá ser menor a la mitad del valor teórico CVh% y para la reproducibilidad el CVR% experimental deberá ser menor al valor teórico de CVhi%.

2.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de resultados se requieren ciertos parámetros estadísticos, como los siguientes:

-Media o promedio: es la cantidad total de la muestra distribuida a partes iguales entre cada observación. En términos matemáticos, es igual a la suma de todos sus valores dividida entre el número de sumandos [32].

$$X = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2.8)$$

Donde:

x_i = valor de una lectura.

n = número de lecturas

-Desviación estándar (σ , S): Es el promedio de lejanía de los valores obtenidos respecto de la media. De tal manera es la raíz cuadrada positiva de la varianza (S^2), que se obtiene a partir de la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones respecto a su media, dividida por $n-1$ [32].

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - x)^2 \quad (2.9)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - x)^2} \quad (2.10)$$

Donde:

x_i = valor de una lectura

X = promedio de la totalidad de lecturas.

n = número de lecturas

-Coeficiente de Variación (CV): También conocido como desviación estándar relativa (RSD), siendo esta la desviación estándar dividida por la media [32]. El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje, siendo aceptable un CV máximo del 10%:

$$\%CV = \frac{s}{x} \times 100 \quad (2.11)$$

Donde:

S = desviación estándar de las lecturas.

X = promedio de la totalidad de lecturas.

Adicionalmente, se aplican pruebas de significación, las cuales son técnicas estadísticas esenciales para realizar el análisis de diferencias dentro de un conjunto de datos, donde se comprueba la veracidad de una hipótesis experimental, llamada hipótesis alternativa (H_1), que afirma las diferencias significativas entre los resultados, mientras que, la hipótesis nula (H_0), demuestra lo contrario [32].

- PRUEBA T- STUDENT

Esta prueba permite comparar las medias de dos grupos de datos y determinar si entre estos las diferencias son estadísticamente significativas. Para ello, se procede a determinar el valor t-student y luego comparar con el valor crítico, obtenido de la tabla t-student a un determinado porcentaje de confianza, normalmente del 95% o un nivel de significación $\alpha = 0,05$ [32]. El valor t se calcula mediante la fórmula:

$$t = \frac{|X - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad (2.12)$$

Donde:

t= t calculado a comparar con t tabulado

x= Media de la muestra

μ = Valor teórico

s= Desviación estándar de la muestra

n= Tamaño de muestras

Si no existen diferencias significativas entre los dos grupos, el t calculado deberá ser inferior al t crítico y se acepta la H_0 , si el t calculado es mayor al t crítico, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 .

- PRUEBA F-FISHER

Es la prueba estadística por la que se puede establecer una relación de varianzas mediante:

$$F = \frac{\sigma M}{\sigma m} \quad (2.13)$$

Donde:

σM = Varianza mayor

σm = Varianza menor

De igual manera, si se obtiene una F crítica o tabulada, mayor a la F calculada, se concluye que las dos varianzas no son significativamente diferentes.

Sin embargo, en este trabajo se usó Statgraphics, un software de análisis estadístico para manejo de grandes volúmenes de información, basado en las teorías de las pruebas t y F, con un módulo LSD (Mínima Diferencia Significativa, por sus siglas en inglés), que permite en corto tiempo establecer si existen o no diferencias significativas entre todas las muestras analizadas.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. VALIDACIÓN PARCIAL

Para comprobar la reproducibilidad y la confiabilidad del método seleccionado se realizó la determinación previa de diversos parámetros de desempeño y su validación.

- LÍMITES INSTRUMENTALES

Los límites se determinaron al leer 10 blancos estándar por debajo del límite de cuantificación esperable, igual a la mitad del nivel más bajo de la curva de calibración para hierro y zinc, 0,064 mg/L y 0,025 mg/L, respectivamente. Los resultados se demuestran en la tabla 3.1, junto con la desviación estándar obtenida de cada caso, cálculos necesarios según las fórmulas 2.2. y 2.3 para obtener los límites de detección y cuantificación, respectivos.

Tabla 3. 1. Resultados de blancos estándar, LOD y LOQ obtenidos para hierro y zinc

Réplica	Hierro	Zinc
Nº	C (mg/L)	C (mg/L)
1	0,062	0,023
2	0,063	0,025
3	0,061	0,024
4	0,062	0,025
5	0,064	0,023
6	0,063	0,027
7	0,064	0,025
8	0,062	0,024
9	0,062	0,025
10	0,062	0,025
S (mg/L)	0,001	0,001
LOD (mg/L)	0,003	0,004
LOQ (mg/L)	0,010	0,012

Como se puede observar en la Tabla 3.1, los LOD y LOQ obtenidos fueron: 0,003 mg/L y 0,010 mg/L para hierro; 0,004 mg/L y 0,012 mg/L para zinc, respectivamente; al ser valores indicativos del desempeño del equipo a concentraciones bajas, se estableció que aquellos valores experimentales menores a los límites de cuantificación determinados, se consideran resultados sin exactitud y precisión aceptables, debido a que la detección del analito en el equipo a concentraciones menores a éstas se vuelve problemática, generando así errores y otorgando valores sin los requerimientos adecuados.

Cabe destacar que los límites obtenidos corresponden a los límites instrumentales más no del método, pero se estima que el mínimo detectable y cuantificable en mg/100g de alimento en hierro sea de: 0,03 y 0,1; y para zinc 0,04 y 0,12, respectivamente. Tales valores, al compararlos con el rango de concentración de cada elemento establecido por la FAO, son bajos. De esta manera, con el método propuesto es posible cuantificar y aceptar con exactitud concentraciones de hierro y zinc hasta un mínimo de 0,1 y 0,12 mg/100g, valores menores a los especificados por la FAO.

- **LINEALIDAD**

Para determinar la linealidad del método, se realizó una curva de calibración por tres semanas consecutivas con los valores de concentración detallados en la tabla 2.1. de cada metal, según las absorbancias obtenidas una vez leídos los patrones de calibración en el equipo, se obtuvieron las gráficas de relación Concentración vs. Absorbancia, que se muestran a continuación:

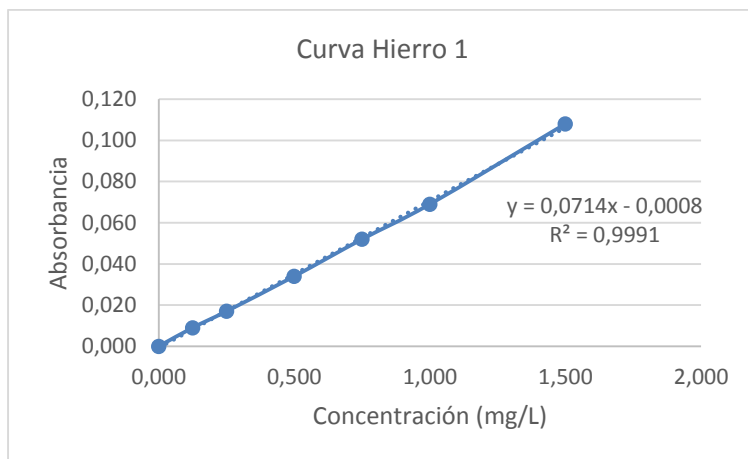


Figura 3. 1. Curva de hierro obtenida en la semana 1

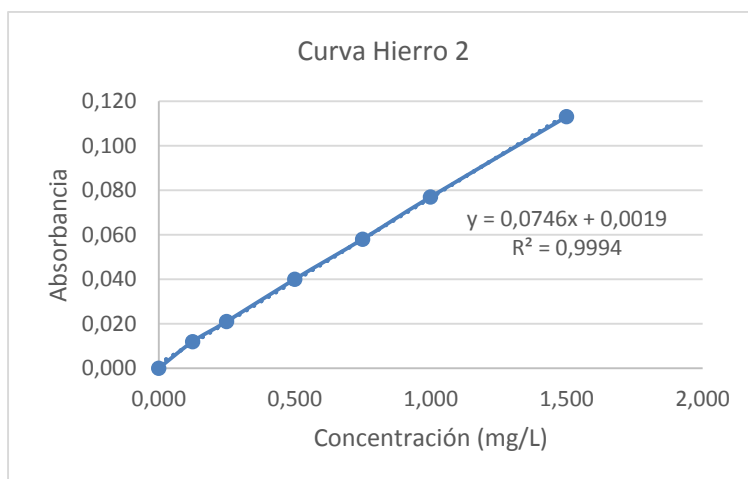


Figura 3. 2. Curva de hierro obtenida en la semana 2

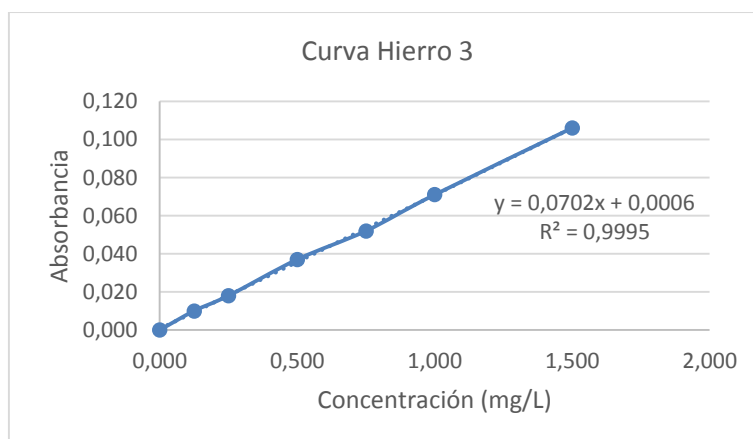


Figura 3. 3. Curva de hierro obtenida en la semana 3

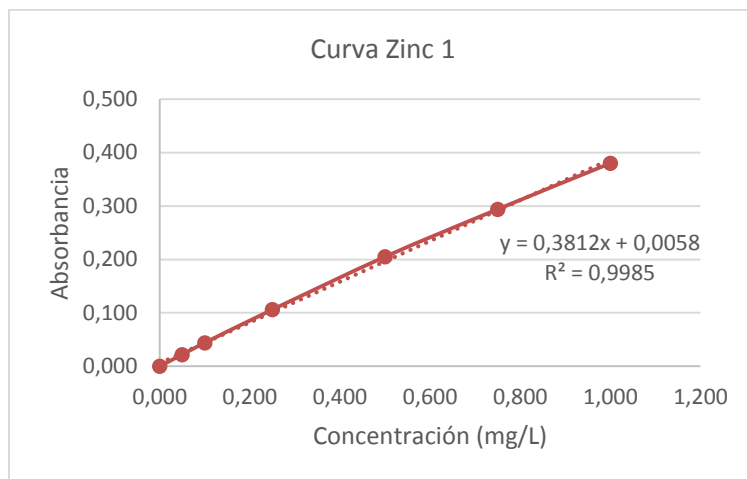


Figura 3. 4. Curva de zinc obtenida en la semana 1

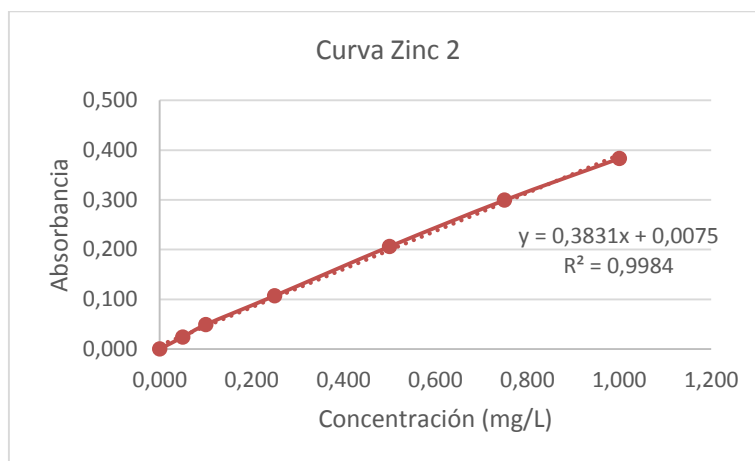


Figura 3. 5. Curva de zinc obtenida en la semana 2

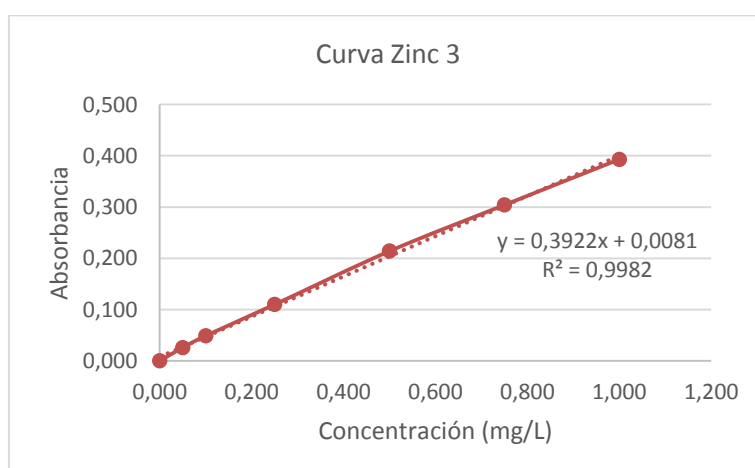


Figura 3. 6. Curva de zinc obtenida en la semana 3

Los resultados obtenidos en las curvas de calibración de cada metal, garantizan un ajuste lineal positivo, con un r^2 no menor al 0,9950, como se detalla en la tabla 3.2.

Tabla 3. 2. Resultados obtenidos del parámetro linealidad

Semana	r^2 obtenido para hierro	r^2 obtenido para zinc	Criterio de aceptación	Observación
1	0,9991	0,9985	$\geq 0,995$	Se aceptan
2	0,9994	0,9984	$\geq 0,995$	Se aceptan
3	0,9995	0,9982	$\geq 0,995$	Se aceptan

- **VERACIDAD**

RECUPERACIÓN

Para determinar la veracidad mediante recuperación, se realizaron fortificaciones en tres niveles distintos (bajo, medio y alto) dentro del rango de concentración teórico de referencia de cada metal, detallados en la tabla 2.4. Dicho procedimiento se realizó por triplicado en tres semanas consecutivas, bajo el mismo método de análisis propuesto para las muestras (AOAC 999,10). El material fortificado fue la trucha; los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3.3 y 3.4 para hierro y zinc, respectivamente, los cálculos se encuentran en el anexo 3, al aplicar la fórmula 2.4.

Tabla 3. 3. Resultados de las fortificaciones para hierro

Semana	Fortificación (mg/L)	Media %R	Media total %R	SD	%CV
1	0,013	99,20	97,45	2,15	2,21
	0,240	98,09			
	0,660	95,05			
2	0,013	99,12	96,03	2,87	2,98
	0,240	95,50			
	0,660	93,47			
3	0,013	93,48	96,42	2,65	2,75
	0,240	97,15			
	0,660	98,63			
		Promedio	96,63	2,56	2,65

Tabla 3. 4. Resultados de las fortificaciones para zinc

Semana	Fortificación (mg/L)	Media %R	Media total %R	SD	%CV
1	0,013	95,90	96,51	2,68	2,78
	0,175	94,18			
	0,400	99,44			
2	0,013	96,14	94,57	3,53	3,73
	0,175	90,53			
	0,400	97,05			
3	0,013	91,88	95,95	3,52	3,67
	0,175	97,88			
	0,400	98,09			
		Promedio	95,68	3,25	3,40

Como se puede observar en ambas tablas, el porcentaje promedio de recuperación experimental obtenido, cumple con el criterio de aceptación establecido por la AOAC, al encontrarse dentro del rango de % de recuperación teórico, 80-110% (ver Tabla 2.5.), además, el promedio de CV% no sobrepasa el límite máximo permitido. Por esta razón, se establece una veracidad aceptable para el método de análisis seleccionado.

- **PRECISIÓN**

• **REPETIBILIDAD**

La repetibilidad se determinó mediante la comparación del coeficiente de variación promedio de cada metal, obtenido en la tabla 3.3 y 3.4, con respecto al coeficiente de variación de Horwitz, el cual se calculó utilizando la fórmula 2.6. con un $c=1,48$ mg/100g en potencia 10 para hierro, y un $c=1,98$ mg/100g en potencia 10 para zinc, medias de concentración obtenidas al leer 10 soluciones en total de blanco matriz (trucha) durante tres semanas consecutivas, dichos resultados se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3. 5. Resultados de blanco matriz para hierro y zinc

Semana	Elemento Muestra (g)	Hierro		Zinc	
		C (mg/L)	C (mg/100g)	C (mg/L)	C (mg/100g)
1	0,5080	0,080	1,57	0,107	2,11
	0,5049	0,080	1,58	0,108	2,14
	0,5106	0,080	1,57	0,109	2,13
2	0,5004	0,074	1,48	0,093	1,86
	0,5272	0,082	1,56	0,099	1,88
	0,5006	0,072	1,44	0,092	1,84
3	0,5035	0,073	1,45	0,098	1,94
	0,5010	0,070	1,40	0,100	2,00
	0,5051	0,068	1,35	0,101	2,00
	0,5067	0,069	1,36	0,098	1,93
		Promedio	1,48	Promedio	1,98

De esta manera, se obtiene un CVh% = 18,75% para hierro y un CVh% = 19,59% para zinc. Donde se destaca que ambos CVr% obtenidos (2,65 % en Fe y 3,40 % en Zn) cumplen con el criterio de aceptación, al ser menores a la mitad del CVh% teórico obtenido ($CVr\% < CVh\%/2$).

- **REPRODUCIBILIDAD**

La reproducibilidad se determinó mediante la comparación del coeficiente de variación promedio obtenido en cada semana, los cuales se detallan en las tablas 3.3. y 3.4, con el coeficiente de variación de Horwitz calculado mediante la fórmula 2.7., con los mismos valores de concentración (c) usados en la repetibilidad. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 3.6.

Tabla 3. 6. Resultados de reproducibilidad para hierro y zinc

Elemento	Hierro		Zn		Criterio de aceptación	Observación
Semana	Media CVR%	CVhi%	Media CVR%	CVhi%		
1	2,21	12,5	2,78	13,06	CVR%<Cvhi%	Cumple
2	2,98		3,73		CVR%<Cvhi%	Cumple
3	2,75		3,67		CVR%<Cvhi%	Cumple

Como se observa en la tabla 3.6, al ser $CVR\% < CVhi\%$ en ambos elementos, se cumple con el criterio de aceptabilidad planteado para la reproducibilidad.

En general, según los resultados obtenidos dentro del parámetro de precisión, se considera que el método seleccionado es repetible y reproducible, siendo este apto para el fin propuesto.

3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa de los elementos esenciales de hierro y zinc en las veinte y una especies de pescados marinos de interés, se realizaron por triplicado en el menor tiempo posible. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.7 y 3.8 para hierro y zinc, respectivamente.

Tabla 3. 7. Resultados de la concentración de hierro en las veinte y una especies de pescado, con sus respectivos análisis estadísticos.

Especie	Replica	Peso (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	Media (mg/100g)	Media (mg/kg)	%CV
Dorado	1	0,5030	0,129	2,56	2,65	26,46	3,79
	2	0,5124	0,134	2,62			
	3	0,5076	0,140	2,76			
Carita	1	0,5008	0,248	4,95	4,84	48,42	2,06
	2	0,5235	0,249	4,76			
	3	0,5064	0,244	4,82			
Sierra	1	0,5104	0,096	1,88	1,77	17,69	5,50
	2	0,5062	0,087	1,72			
	3	0,5039	0,086	1,71			
Bagre	1	0,5234	0,105	2,01	1,91	19,07	5,27
	2	0,5129	0,098	1,91			
	3	0,5041	0,091	1,81			
Cherna	1	0,5016	0,041	0,82	0,86	8,57	6,18
	2	0,5015	0,046	0,92			
	3	0,5020	0,042	0,84			
Lisa	1	0,5030	0,225	4,47	4,32	43,17	3,19
	2	0,5034	0,212	4,21			
	3	0,5062	0,216	4,27			
Bandera	1	0,5098	0,206	4,04	4,19	41,92	3,28
	2	0,5059	0,218	4,31			
	3	0,5088	0,215	4,23			
Camotillo	1	0,5013	0,060	1,20	1,20	12,04	1,13
	2	0,5083	0,062	1,22			
	3	0,5269	0,063	1,20			
Murico	1	0,5138	0,043	0,84	0,82	8,22	5,45
	2	0,5052	0,039	0,77			
	3	0,5012	0,043	0,86			
Picudo	1	0,5129	0,102	1,99	2,06	20,55	3,14
	2	0,5006	0,106	2,12			
	3	0,5002	0,103	2,06			
Corvina	1	0,5001	0,077	1,54	1,54	15,38	2,56
	2	0,5009	0,079	1,58			
	3	0,5005	0,075	1,50			
Guaba	1	0,5099	0,043	0,84	0,79	7,89	6,07
	2	0,5037	0,038	0,75			
	3	0,5078	0,039	0,77			

Especie	Replica	Peso (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	Media (mg/100g)	Media (mg/Kg)	%CV
Atún	1	0,5038	0,270	5,36	5,31	53,12	2,61
	2	0,5054	0,274	5,42			
	3	0,5042	0,260	5,16			
Pargo	1	0,5021	0,042	0,84	0,89	8,91	6,13
	2	0,5075	0,048	0,95			
	3	0,5048	0,045	0,89			
Lechuza	1	0,5052	0,079	1,56	1,49	14,90	4,89
	2	0,5041	0,075	1,49			
	3	0,5007	0,071	1,42			
Cabezudo	1	0,5037	0,068	1,35	1,28	12,82	5,41
	2	0,5036	0,061	1,21			
	3	0,5062	0,065	1,28			
Tiburón	1	0,5131	0,198	3,86	3,79	37,93	3,66
	2	0,5095	0,198	3,89			
	3	0,5064	0,184	3,63			
Bonito Sierra	1	0,5071	0,186	3,67	3,68	36,79	2,74
	2	0,5073	0,192	3,78			
	3	0,5273	0,189	3,58			
Wahoo	1	0,5204	0,055	1,06	1,08	10,78	5,80
	2	0,5055	0,052	1,03			
	3	0,5051	0,058	1,15			
Albacora	1	0,5083	0,263	5,17	5,24	52,40	2,21
	2	0,5025	0,27	5,37			
	3	0,5008	0,259	5,17			
Perela	1	0,5022	0,071	1,41	1,45	14,48	3,96
	2	0,5019	0,076	1,51			
	3	0,5085	0,072	1,42			

Al analizar los datos de la tabla 3.7, se pudo determinar que la especie con mayor concentración de hierro, es el atún, con un promedio de 5,31 mg por cada 100g de alimento, mientras que, la especie con menor concentración, es la guaba, con un promedio de 0,79 mg por cada 100 g de alimento. A su vez, los CV% obtenidos dentro de todo el conjunto de datos, son menores al 10% aceptable, lo que indica una buena dispersión de los datos cercanos a la media.

Tabla 3. 8. Resultados de la concentración de zinc en las veinte y una especies de pescado, con sus respectivos análisis estadísticos.

Especie	Replica	Peso (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	Media (mg/100g)	Media (mg/kg)	%CV
Dorado	1	0,5030	0,098	1,95	2,04	20,35	5,01
	2	0,5124	0,103	2,01			
	3	0,5076	0,109	2,15			
Carita	1	0,5008	0,114	2,28	2,25	22,54	2,39
	2	0,5235	0,120	2,29			
	3	0,5064	0,111	2,19			
Sierra	1	0,5104	0,119	2,33	2,22	22,16	4,65
	2	0,5062	0,108	2,13			
	3	0,5039	0,110	2,18			
Bagre	1	0,5234	0,124	2,37	2,32	23,23	2,39
	2	0,5129	0,120	2,34			
	3	0,5041	0,114	2,26			
Cherna	1	0,5016	0,042	0,84	0,79	7,91	5,28
	2	0,5015	0,039	0,78			
	3	0,5020	0,038	0,76			
Lisa	1	0,5030	0,070	1,39	1,37	13,69	1,77
	2	0,5034	0,069	1,37			
	3	0,5062	0,068	1,34			
Bandera	1	0,5098	0,105	2,06	2,02	20,20	1,70
	2	0,5059	0,101	2,00			
	3	0,5088	0,102	2,00			
Camotillo	1	0,5013	0,075	1,50	1,56	15,62	3,83
	2	0,5083	0,082	1,61			
	3	0,5269	0,083	1,58			
Murico	1	0,5138	0,075	1,46	1,52	15,20	5,53
	2	0,5052	0,075	1,48			
	3	0,5012	0,081	1,62			
Picudo	1	0,5129	0,086	1,68	1,68	16,78	5,99
	2	0,5006	0,079	1,58			
	3	0,5002	0,089	1,78			
Corvina	1	0,5001	0,083	1,66	1,70	17,05	5,79
	2	0,5009	0,082	1,64			
	3	0,5005	0,091	1,82			
Guaba	1	0,5099	0,115	2,26	2,37	23,73	5,71
	2	0,5037	0,127	2,52			
	3	0,5078	0,119	2,34			

Especie	Replica	Peso (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	Media (mg/100g)	Media (mg/kg)	%CV
Atún	1	0,5038	0,104	2,06	1,98	19,82	5,28
	2	0,5054	0,102	2,02			
	3	0,5042	0,094	1,86			
Pargo	1	0,5021	0,070	1,39	1,35	13,47	3,25
	2	0,5075	0,068	1,34			
	3	0,5048	0,066	1,31			
Lechuza	1	0,5052	0,069	1,37	1,33	13,31	2,90
	2	0,5041	0,065	1,29			
	3	0,5007	0,067	1,34			
Cabezudo	1	0,5037	0,074	1,47	1,49	14,87	3,73
	2	0,5036	0,078	1,55			
	3	0,5062	0,073	1,44			
Tiburón	1	0,5131	0,086	1,68	1,62	16,22	2,91
	2	0,5095	0,081	1,59			
	3	0,5064	0,081	1,60			
Bonito Sierra	1	0,5071	0,073	1,44	1,38	13,82	4,06
	2	0,5073	0,070	1,38			
	3	0,5273	0,070	1,33			
Wahoo	1	0,5204	0,121	2,33	2,27	22,73	2,04
	2	0,5055	0,114	2,26			
	3	0,5051	0,113	2,24			
Albacora	1	0,5083	0,094	1,85	1,87	18,66	5,56
	2	0,5025	0,089	1,77			
	3	0,5008	0,099	1,98			
Perela	1	0,5022	0,078	1,55	1,49	14,87	5,55
	2	0,5019	0,070	1,39			
	3	0,5085	0,077	1,51			

Al observar la tabla 3.8 se pudo determinar que la especie con mayor concentración de zinc, es la guaba, con un promedio de 2,37 mg por cada 100g de alimento, mientras que, la especie con menor concentración, es la cherna, con un promedio de 0,79 mg por cada 100 g de alimento. De igual manera, los CV% obtenidos dentro de todo el conjunto de datos, son menores al 10%, lo que nos indica una dispersión aceptable de los datos cercanos a la media.

Al comparar los resultados obtenidos en los pescados analizados con la concentración estimada de hierro y zinc en carnes rojas, carne de mayor consumo debido a su bajo precio y disponibilidad, con un contenido de hierro que oscila alrededor de 2,6 mg/100g de alimento y zinc igual a 3,3 mg/100g; y carnes blancas con un contenido de hierro menor que oscila en 1,5 mg/100g de alimento y zinc igual a 1,3 mg/100g de alimento en base seca [3], demuestran que la cantidad de hierro en atún es mayor, y la de zinc en guaba, son similares a las carnes rojas, mientras que, en las blancas estas sobrepasan los valores. De esta manera, se logra demostrar la alta posibilidad de que ambas especies logren ser fuentes significativas de alimento con un aporte deseado de ambos micronutrientes [3].

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con el rango de concentración en pescados para cada micronutriente en base seca, establecido por la FAO, (hierro: 1-5.6 mg/100g y zinc: 0.23–2.1 mg/100g), se puede observar que en el caso del hierro en la tabla 3.7, todas las concentraciones de las diversas especies analizadas se encuentran dentro del rango mencionado, mientras que, en tabla 3.8 para zinc, las especies: carita, bragre, sierra, guaba y wahoo superan el valor máximo, sin embargo, las diferencias son mínimas, dado a que la variación se encuentra entre 0,1-0,2 mg/100g, obteniéndose inclusive un %CV menor al 10% aceptable entre el valor de referencia y el experimental de dichas especies. De esta manera, se pueden considerar resultados válidos, además, como lo menciona la FAO, en este tipo de análisis obtener una adecuada precisión es imposible, ya que la composición química puede variar ampliamente, no sólo de peces a peces de diferente especie, sino también dentro de un pez individual.

Analizando los resultados de la concentración de hierro y zinc en diversas especies en estudios relacionados, se logró observar similitud y discrepancia en los resultados, independientemente de la estación geográfica a la cual están referidas, por ejemplo, según el análisis realizado por Tuzen en 2009, en el músculo de diferentes especies del mar negro en Turquía, presentaron concentraciones de hierro en el filete entre 36.2 - 145 mg/kg, valores altos a comparación a los obtenidos en esta investigación [39].

Mientras que, Sivaperumal en 2006, analizó diversos tipos de especies marinas recolectadas en los mercados más concurridos de India, presentando una concentración de zinc de 0,66-39.2 mg/kg, abarcando valores similares a los alcanzados en la investigación. Por otra parte, García en 2013, concluyó que la concentración de hierro, en especies obtenidas en mercados concurridos de tres ciudades principales de Perú, se encuentra alrededor de 1.57-32.17 mg/kg y zinc igual a 33,44-11,65 mg/kg, resaltando la diferencia obtenida entre las especies analizadas por la época creciente y vaciante, en las cuales fueron recolectadas las muestras [40, 41].

En Venezuela, Márquez, durante el año 2008, demostró que, en varios tejidos musculares de peces, el hierro se encuentra desde 2,68- 30,27mg/kg, y en zinc igual a 8,71- 25,04 mg/kg, en este caso se detalla que los hábitos ecológicos de las diferentes especies, afectan en gran forma la captación del metal por el pez, por lo que la diferencia de concentración puede variar significativamente [42].

En general, las diferencias presentadas se deben a que la mayoría de investigaciones corresponden a especies diferentes, cuyas características fisiológicas únicas y específicas determinan la acumulación de elementos en sus tejidos, siendo factores tales como su: dieta, sexo, edad y tamaño corporal, los que influyen directamente su captación. De igual manera, estudios experimentales han demostrado que la acumulación de metales en los tejidos de peces, depende principalmente de la concentración de los elementos en el agua y del período de exposición, aunque otros factores ambientales como: la salinidad, pH, dureza y temperatura del agua pueden también desempeñar funciones importantes dentro de los niveles de estos elementos [37].

3.3 COMPARACION ENTRE ESPECIES

Las Tablas 3.9 y 3.10, se obtuvieron gracias al programa Statgraphics a un nivel de confianza del 0.5, para hierro y zinc, respectivamente; en ellas se demuestran, en qué especies de pescados no existen diferencias significativas entre las medias, si en la sección grupos homogéneos las X se encuentran alineadas, siendo así una ilustración gráfica de qué media es significativamente diferente de cuáles otras. Cada grupo homogéneo obtenido presenta una coloración distintiva para facilitar su comprensión.

Tabla 3. 9. Resultados prueba de comparación múltiple para hierro

Pescados	Casos	Media	Grupos homogéneos																	
Guaba	3	0,786667	x																	
Murico	3	0,823333	x																	
Cherna	3	0,86	x																	
Pargo	3	0,893333	x																	
Wahoo	3	1,08		x																
Camotillo	3	1,20667		x	x															
Cabezudo	3	1,28			x															
Perela	3	1,44667				x														
Lechuza	3	1,49				x														
Corvina	3	1,54				x														

dos últimas si existe una diferencia significativa entre sus medias. Lo mismo se aplica para los resultados de zinc en la Tabla 3.10. El detalle de los valores de las diferencias significativas en todos los casos se observa en el anexo 1.

Las diferencias significativas existentes entre las especies se deben principalmente, por un lado, a que los peces concentran metales en el cuerpo en proporciones variables que dependen de su fisiología, y por otro a las condiciones medio ambientales y hábitos ecológicos en las que habitan, como se mencionó anteriormente.

Las Figuras 3.7 y 3.8 a continuación, muestran respectivamente los contenidos de hierro y zinc de cada una de las especies de pescados analizados, además de la dispersión de valores entre los tres análisis realizados para cada caso. La interpretación de resultados en las figuras es solo visual y se complementa con los valores en las tablas 3.9 y 3.10.

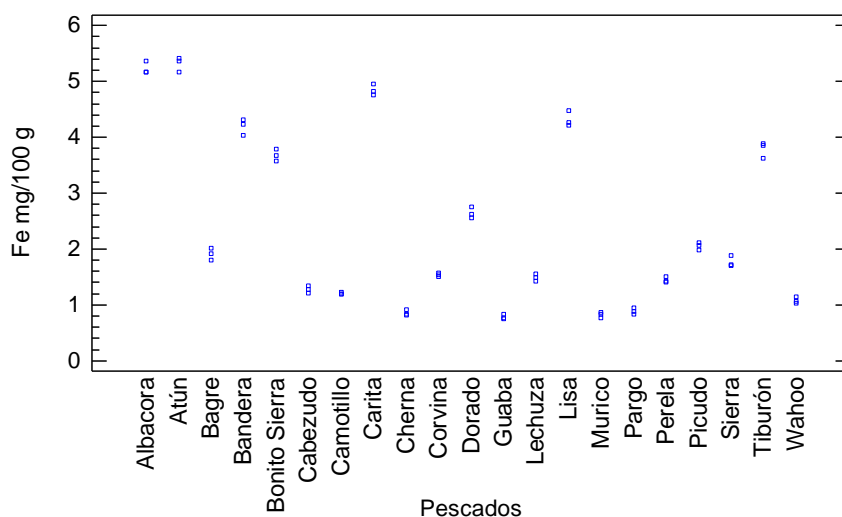


Figura 3. 7. Gráfico de dispersión para hierro

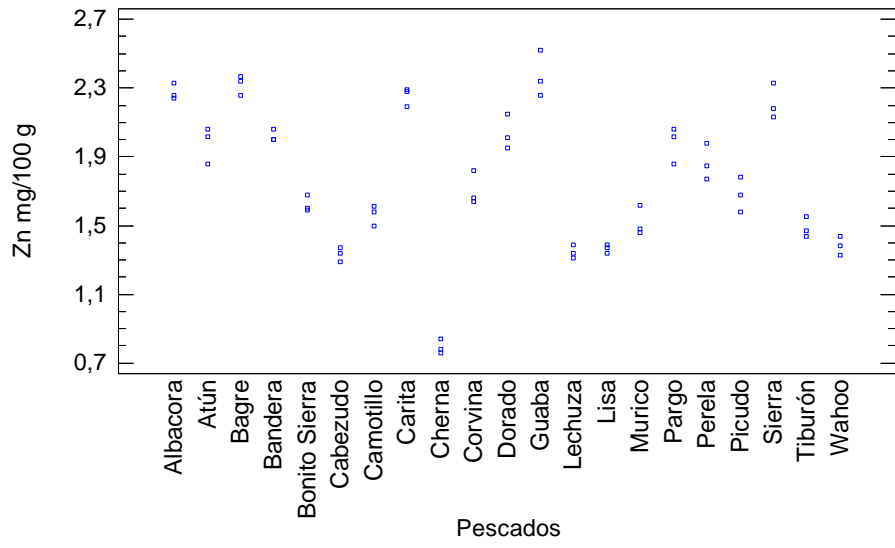


Figura 3. 8. Gráfico de dispersión para zinc

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

De las especies marinas muestreadas en Guayaquil y Manta, en abril y junio del 2015, y analizadas en el transcurso del año 2016, se determinó que el atún es la especie con mayor concentración de hierro, con un promedio igual a 5,31 mg/100g de alimento, mientras que, la especie de menor concentración, es la guaba, con un promedio de 0,79 mg por cada 100g de alimento.

De las especies marinas muestreadas en Guayaquil y Manta, en abril y junio del 2015 y analizadas en el transcurso del año 2016, se determinó que la guaba presenta la mayor concentración de zinc con un promedio de 2,37 mg/100g, mientras que, la especie de menor concentración, es la cherna, con un promedio de 0,79 mg por cada 100g de alimento.

Los resultados obtenidos de hierro y zinc en atún y guaba, son similares a la carne roja. De esta manera, se logra demostrar la alta posibilidad de que ambas especies logren ser fuentes significativas de alimento con un aporte adecuado de estos micronutrientes.

Los análisis estadísticos permiten homologar, que, así como hay especies con contenidos nutricionales muy diferentes, hay otras que pueden utilizarse indistintamente

con el mismo nivel de beneficio, como es el caso del atún y la albacora con su contenido en hierro, y la guaba con la albacora y el bagre en zinc.

La existencia de diferencias significativas entre las muestras permite asegurar que no todas las especies de pescado analizadas son una gran fuente de hierro y zinc, sin embargo, esta diferencia puede deberse tanto a la fisiología del pez, como a factores medioambientales y naturales.

Los resultados en la validación parcial, al evaluar los parámetros de límites de detección y cuantificación, linealidad, exactitud y precisión, son satisfactorios, al cumplir con los criterios de aceptabilidad establecidos en el plan, según la Guía técnica de Validación de métodos de Chile, por lo tanto, se considera que el método analítico ejecutado es aceptable.

4.2 RECOMENDACIONES

Cabe destacar que, para adquirir la concentración diaria recomendada de cada mineral, se debe combinar al atún y la guaba, con otras fuentes alimenticias, ya sean de origen animal o vegetal, que aporten con la cantidad de nutrientes necesarios para el buen funcionamiento del organismo.

Se recomienda para futuras investigaciones, el análisis de elementos traza en pescados marinos del Ecuador muestreados en diferentes épocas del año, ya que este factor influye directamente en la captación y concentración de los elementos en sus tejidos,

siendo posible que en los meses de invierno cambie la concentración de los elementos, tanto en el agua de mar, como en los peces, obteniéndose así, datos comparativos de gran importancia. De igual manera, se puede incrementar el número de micronutrientes a analizar, cómo puede ser el calcio y sodio, importantes para el desarrollo de los peces.

CAPÍTULO V

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Melo, V. y Cuatmazi, O. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos. 2ª edición, Editorial Reverté, S.A., México.
2. Organización Mundial de la Salud, OMS, (2014). <http://www.who.int/topics/nutrition/es/>, 6 de Agosto de 2016.
3. Carvajal, G. (2001). *Valor nutricional de la carne*. Corporación de Fomento Ganadero. Costa Rica.
4. Erosky Consumer, (n,d). El pescado en relación con la salud, <http://pescadosymariscos.consumer.es/salud-y-pescados/las-ventajas-para-la-salud-del-consumo-de-pescado>, 13 de mayo de 2016.
5. Zakaz Ribí, (2014). Pescados al por mayor en Ecuador, <http://es.zakazribi.com/catalog/>, 08 de junio de 2016.
6. Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, (2009). Principios básicos sobre nutrición y salud. <http://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dieteticaI/guia/PDF/Guia%20de%20Alimentacion%20y%20Salud%20%20Guia%20Nutricional.pdf>, 6 de agosto de 2016.

7. Williams, M. (2002). *Nutrición para la salud, la condición física y el deporte*, 5ª edición, Editorial Paidotribo, España.
8. Rodríguez, M. y Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición*. 1ª edición, Ediciones Díaz de Santos, S.A, España.
9. Ozonas, B. (n,d). Importancia del hierro en la alimentación, <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/402/423>, 10 de mayo de 2016.
10. National Institutes of Health, NIH. (2016). Health information Iron. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-DatosEnEspanol/>, 02 de octubre del 2016.
11. Verdú, J. (2013). *Nutrición para educadores*. 2ª edición, Ediciones Díaz de Santos, S.A, España.
12. Fuente, X. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular*. 2ª edición, Editorial Reverté, S.A., México.
13. Brito, G. (2006). *Revisión de metodologías de cálculo de la absorción del hierro*. Disertación de Licenciatura en Nutrición, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
14. Benito, J. y Calvo, S. (2014). *Alimentación y nutrición en la vida activa*. 1ra edición, Universidad Nacional de Educación a Distancia, España.

15. Bellido, D. (2006). *Manual de nutrición y metabolismo*. 1ra edición, Ediciones Díaz de Santos, S.A, España.
16. González, J. y Sánchez, P. (2006). *Nutrición en el deporte*. 1ra edición, Ediciones Díaz de Santos, S.A, España.
17. National Institutes of Health, NIH. (2016). Health information Zinc. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-DatosEnEspañol/>, 02 de Octubre de 2016.
18. Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva*. 2da edición, Editorial Médica Panamericana. España.
19. Tarea escolar. (2015). Partes de un pez. <http://www.tutareaescolar.com/2015/06/14/partes-de-un-pez/>, 02 de Octubre del 2016.
20. Sivakumar, V., Driscoll, B. y Obenauf, R. (2007). Trace Elements in Fish and Fish Oil Supplements. http://www.spexcertiprep.com/knowledge-base/files/AppNote_FishOil.pdf, 02 de Octubre del 2016.
21. Jiménez, P. y Béarez, P. (2004). *Peces marinos del Ecuador continental. Tomo I y II*, 1ª Edición, SIMBIOE, Ecuador.
22. Kastenmayer, P. (2007). Análisis de minerales y elementos traza en alimentos, <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s22.htm>, 10 de Octubre de 2016.
23. Universidad de Alicante. (2015). Digestión con horno microondas, <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis/digestion-con-horno-microondas.html>, 10 de Octubre de 2016.
24. Skoog, D., Holler, F., y Nieman T., (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, 5ª edición, Mc Graw Hill, España.

25. Walton. H., (2005), *Análisis químico e instrumental moderno*, 3ª edición, Editorial Reverte, España.
26. Food and Agriculture Organization, FAO. (2001). The composition of fish. <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e01.htm>, 18 de enero de 2017.
27. Jacinto, M. (2007). Concentraciones traza de metales en especies marinas de la bahía de Huarmey, Ancash, Perú. *Revista Per. Biol*, 2. Pp. 307-311.
28. Villarreal, D. y Sánchez, J. (2016). Comparación y valoración de mercurio (Hg) y cadmio (Cd) en la especie Dorado (*Coryphaena hippurus*) que se consume en Manta, Ecuador. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.
29. Márquez, A. (2008). Cuantificación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces y crustáceos de la laguna de Unare, estado Anzoátegui, Venezuela, *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVIII, N° 1*, pp. 73 – 86.
30. US Department of Agriculture. USDA. (2010). Informe sobre Inocuidad de alimentos. https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/931068e4-c4c3-4f00-8222-19d40fcd034d/Freezing_and_Food_Safety_SP.pdf?MOD=AJPERES, 18 de Enero de 2017.
31. Gómez-Sánchez, A. (2007). Aspectos tecnológicos de la congelación en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 1, pp. 80- 96.
32. Instituto de Salud Pública Chile. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf, 21 de septiembre de 2016.

33. Entidad Nacional de Acreditación. ENAC. (2014). Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. <https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30>, 18 de septiembre de 2016.
34. Morillas, P.P. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados, 1ª edición, Eurolab, España.
35. Yasmeeen, K. (2016). Trace metals health risk appraisal in fish species of Arabian Sea. *Springer Plus*, 5, pp 859.
36. Rizzo, A. (2010). Concentraciones de metales pesados en distintos compartimentos de lagos andinos de Patagonia Norte. *Ecología austral*, 20, pp 155-171.
37. Márquez, A. (2008). Cuantificación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces y crustáceos de la laguna de Unare, Estado Anzoátegui, Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ*, 18, pp 73-86.
38. Kress, N., Herut, B. (1999). Trace element levels in fish from clean and polluted coastal marine sites in the Mediterranean Sea, Red Sea and North Sea, Helgoland *Marine Research*, 53, pp 163-170.
39. Vivar, M. (2009). *Estudio y distribución de elementos traza en Salmo salar*. Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Austral de Chile, Chile.
40. Spiess, A. (2010). *Determinación de elementos traza (Pb, Cd, Cu, Mn, Zn, Fe y As) en trucha arcoiris (oncorhynchus mykiss) mediante espectrofotometría de absorción atómica en la X y XIV regiones de Chile*. Disertación de Químico Farmacéutico, Universidad Austral de Chile, Chile.

41. Gu, Y.-G. (2015). Heavy metal concentrations in wild fishes captured from the South China Sea and associated health risks. *Marine Pollution Bulletin*.
42. Tuzen, M. (2009). Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the black sea, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp 1785-1790.
43. Sivaperumal, P. (2007). Heavy metal concentrations in fish, shellfish and fish products from internal markets of India vis- a- vis international standards. *Food Chemistry*, 102, pp 612-620.
44. García, D. (2013). Contenido de metales pesados en pescados comercializados en Iquitos, Nauta y Requena. *Ciencia amazónica* Vol. 3, No. 1, pp. 33-42

ANEXOS

ANEXO 1: RESULTADOS COMPARACIÓN INTERESPECIES

HIERRO

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Albacora – Atún		-0,076667	0,14911
Albacora – Bagre	*	3,32667	0,14911
Albacora – Bandera	*	1,04333	0,14911
Albacora - Bonito Sierra	*	1,56	0,14911
Albacora – Cabezudo	*	3,95667	0,14911
Albacora – Camotillo	*	4,03	0,14911
Albacora – Carita	*	0,393333	0,14911
Albacora – Cherna	*	4,37667	0,14911
Albacora – Corvina	*	3,69667	0,14911
Albacora – Dorado	*	2,59	0,14911
Albacora – Guaba	*	4,45	0,14911
Albacora – Lechuza	*	3,74667	0,14911
Albacora – Lisa	*	0,92	0,14911
Albacora – Murico	*	4,41333	0,14911
Albacora - Pargo	*	4,34333	0,14911
Albacora - Perela	*	3,79	0,14911
Albacora - Picudo	*	3,18	0,14911
Albacora - Sierra	*	3,46667	0,14911
Albacora - Tiburón	*	1,44333	0,14911
Albacora - Wahoo	*	4,15667	0,14911
Atún - Bagre	*	3,40333	0,14911
Atún - Bandera	*	1,12	0,14911
Atún - Bonito Sierra	*	1,63667	0,14911
Atún - Cabezudo	*	4,03333	0,14911
Atún - Camotillo	*	4,10667	0,14911
Atún - Carita	*	0,47	0,14911
Atún - Cherna	*	4,45333	0,14911
Atún - Corvina	*	3,77333	0,14911
Atún - Dorado	*	2,66667	0,14911
Atún - Guaba	*	4,52667	0,14911
Atún - Lechuza	*	3,82333	0,14911
Atún – Lisa	*	0,996667	0,14911
Atún - Murico	*	4,49	0,14911
Atún - Pargo	*	4,42	0,14911
Atún - Perela	*	3,86667	0,14911
Atún - Picudo	*	3,25667	0,14911
Atún - Sierra	*	3,54333	0,14911
Atún - Tiburón	*	1,52	0,14911
Atún - Wahoo	*	4,23333	0,14911
Bagre - Bandera	*	-2,28333	0,14911
Bagre - Bonito Sierra	*	-1,76667	0,14911
Bagre - Cabezudo	*	0,63	0,14911
Bagre - Camotillo	*	0,703333	0,14911
Bagre - Carita	*	-2,93333	0,14911
Bagre - Cherna	*	1,05	0,14911
Bagre - Corvina	*	0,37	0,14911
Bagre - Dorado	*	-0,736667	0,14911
Bagre - Guaba	*	1,12333	0,14911
Bagre - Lechuza	*	0,42	0,14911
Bagre - Lisa	*	-2,40667	0,14911
Bagre - Murico	*	1,08667	0,14911
Bagre - Pargo	*	1,01667	0,14911
Bagre - Perela	*	0,463333	0,14911

Bagre - Picudo		-0,146667	0,14911
Bagre - Sierra		0,14	0,14911
Bagre - Tiburón	*	-1,88333	0,14911
Bagre - Wahoo	*	0,83	0,14911
Bandera - Bonito Sierra	*	0,516667	0,14911
Bandera - Cabezudo	*	2,91333	0,14911
Bandera - Camotillo	*	2,98667	0,14911
Bandera - Carita	*	-0,65	0,14911
Bandera - Cherna	*	3,33333	0,14911
Bandera - Corvina	*	2,65333	0,14911
Bandera - Dorado	*	1,54667	0,14911
Bandera - Guaba	*	3,40667	0,14911
Bandera - Lechuza	*	2,70333	0,14911
Bandera - Lisa		-0,123333	0,14911
Bandera - Murico	*	3,37	0,14911
Bandera - Pargo	*	3,3	0,14911
Bandera - Perela	*	2,74667	0,14911
Bandera - Picudo	*	2,13667	0,14911
Bandera - Sierra	*	2,42333	0,14911
Bandera - Tiburón	*	0,4	0,14911
Bandera - Wahoo	*	3,11333	0,14911
Bonito Sierra - Cabezudo	*	2,39667	0,14911
Bonito Sierra - Camotillo	*	2,47	0,14911
Bonito Sierra - Carita	*	-1,16667	0,14911
Bonito Sierra - Cherna	*	2,81667	0,14911
Bonito Sierra - Corvina	*	2,13667	0,14911
Bonito Sierra - Dorado	*	1,03	0,14911
Bonito Sierra - Guaba	*	2,89	0,14911
Bonito Sierra - Lechuza	*	2,18667	0,14911
Bonito Sierra - Lisa	*	-0,64	0,14911
Bonito Sierra - Murico	*	2,85333	0,14911
Bonito Sierra - Pargo	*	2,78333	0,14911
Bonito Sierra - Perela	*	2,23	0,14911
Bonito Sierra - Picudo	*	1,62	0,14911
Bonito Sierra - Sierra	*	1,90667	0,14911
Bonito Sierra - Tiburón		-0,116667	0,14911
Bonito Sierra - Wahoo	*	2,59667	0,14911
Cabezudo - Camotillo		0,0733333	0,14911
Cabezudo - Carita	*	-3,56333	0,14911
Cabezudo - Cherna	*	0,42	0,14911
Cabezudo - Corvina	*	-0,26	0,14911
Cabezudo - Dorado	*	-1,36667	0,14911
Cabezudo - Guaba	*	0,493333	0,14911
Cabezudo - Lechuza	*	-0,21	0,14911
Cabezudo - Lisa	*	-3,03667	0,14911
Cabezudo - Murico	*	0,456667	0,14911
Cabezudo - Pargo	*	0,386667	0,14911
Cabezudo - Perela	*	-0,166667	0,14911
Cabezudo - Picudo	*	-0,776667	0,14911
Cabezudo - Sierra	*	-0,49	0,14911
Cabezudo - Tiburón	*	-2,51333	0,14911
Cabezudo - Wahoo	*	0,2	0,14911
Camotillo - Carita	*	-3,63667	0,14911
Camotillo - Cherna	*	0,346667	0,14911
Camotillo - Corvina	*	-0,333333	0,14911
Camotillo - Dorado	*	-1,44	0,14911
Camotillo - Guaba	*	0,42	0,14911
Camotillo - Lechuza	*	-0,283333	0,14911
Camotillo - Lisa	*	-3,11	0,14911
Camotillo - Murico	*	0,383333	0,14911
Camotillo - Pargo	*	0,313333	0,14911
Camotillo - Perela	*	-0,24	0,14911
Camotillo - Picudo	*	-0,85	0,14911

Camotillo - Sierra	*	-0,563333	0,14911
Camotillo - Tiburón	*	-2,58667	0,14911
Camotillo - Wahoo		0,126667	0,14911
Carita - Cherna	*	3,98333	0,14911
Carita - Corvina	*	3,30333	0,14911
Carita - Dorado	*	2,19667	0,14911
Carita - Guaba	*	4,05667	0,14911
Carita - Lechuza	*	3,35333	0,14911
Carita - Lisa	*	0,526667	0,14911
Carita - Murico	*	4,02	0,14911
Carita - Pargo	*	3,95	0,14911
Carita - Perela	*	3,39667	0,14911
Carita - Picudo	*	2,78667	0,14911
Carita - Sierra	*	3,07333	0,14911
Carita - Tiburón	*	1,05	0,14911
Carita - Wahoo	*	3,76333	0,14911
Cherna - Corvina	*	-0,68	0,14911
Cherna - Dorado	*	-1,78667	0,14911
Cherna - Guaba		0,0733333	0,14911
Cherna - Lechuza	*	-0,63	0,14911
Cherna - Lisa	*	-3,45667	0,14911
Cherna - Murico		0,0366667	0,14911
Cherna - Pargo		-0,0333333	0,14911
Cherna - Perela	*	-0,586667	0,14911
Cherna - Picudo	*	-1,19667	0,14911
Cherna - Sierra	*	-0,91	0,14911
Cherna - Tiburón	*	-2,93333	0,14911
Cherna - Wahoo	*	-0,22	0,14911
Corvina - Dorado	*	-1,10667	0,14911
Corvina - Guaba	*	0,753333	0,14911
Corvina - Lechuza		0,05	0,14911
Corvina - Lisa	*	-2,77667	0,14911
Corvina - Murico	*	0,716667	0,14911
Corvina - Pargo	*	0,646667	0,14911
Corvina - Perela		0,0933333	0,14911
Corvina - Picudo	*	-0,516667	0,14911
Corvina - Sierra	*	-0,23	0,14911
Corvina - Tiburón	*	-2,25333	0,14911
Corvina - Wahoo	*	0,46	0,14911
Dorado - Guaba	*	1,86	0,14911
Dorado - Lechuza	*	1,15667	0,14911
Dorado - Lisa	*	-1,67	0,14911
Dorado - Murico	*	1,82333	0,14911
Dorado - Pargo	*	1,75333	0,14911
Dorado - Perela	*	1,2	0,14911
Dorado - Picudo	*	0,59	0,14911
Dorado - Sierra	*	0,876667	0,14911
Dorado - Tiburón	*	-1,14667	0,14911
Dorado - Wahoo	*	1,56667	0,14911
Guaba - Lechuza	*	-0,703333	0,14911
Guaba - Lisa	*	-3,53	0,14911
Guaba - Murico		-0,0366667	0,14911
Guaba - Pargo		-0,106667	0,14911
Guaba - Perela	*	-0,66	0,14911
Guaba - Picudo	*	-1,27	0,14911
Guaba - Sierra	*	-0,983333	0,14911
Guaba - Tiburón	*	-3,00667	0,14911
Guaba - Wahoo	*	-0,293333	0,14911
Lechuza - Lisa	*	-2,82667	0,14911
Lechuza - Murico	*	0,666667	0,14911
Lechuza - Pargo	*	0,596667	0,14911
Lechuza - Perela		0,0433333	0,14911
Lechuza - Picudo	*	-0,566667	0,14911

Lechuza - Sierra	*	-0,28	0,14911
Lechuza - Tiburón	*	-2,30333	0,14911
Lechuza - Wahoo	*	0,41	0,14911
Lisa - Murico	*	3,49333	0,14911
Lisa - Pargo	*	3,42333	0,14911
Lisa - Perela	*	2,87	0,14911
Lisa - Picudo	*	2,26	0,14911
Lisa - Sierra	*	2,54667	0,14911
Lisa - Tiburón	*	0,523333	0,14911
Lisa - Wahoo	*	3,23667	0,14911
Murico - Pargo		-0,07	0,14911
Murico - Perela	*	-0,623333	0,14911
Murico - Picudo	*	-1,23333	0,14911
Murico - Sierra	*	-0,946667	0,14911
Murico - Tiburón	*	-2,97	0,14911
Murico - Wahoo	*	-0,256667	0,14911
Pargo - Perela	*	-0,553333	0,14911
Pargo - Picudo	*	-1,16333	0,14911
Pargo - Sierra	*	-0,876667	0,14911
Pargo - Tiburón	*	-2,9	0,14911
Pargo - Wahoo	*	-0,186667	0,14911
Perela - Picudo	*	-0,61	0,14911
Perela - Sierra	*	-0,323333	0,14911
Perela - Tiburón	*	-2,34667	0,14911
Perela - Wahoo	*	0,366667	0,14911
Picudo - Sierra	*	0,286667	0,14911
Picudo - Tiburón	*	-1,73667	0,14911
Picudo - Wahoo	*	0,976667	0,14911
Sierra - Tiburón	*	-2,02333	0,14911
Sierra - Wahoo	*	0,69	0,14911
Tiburón - Wahoo	*	2,71333	0,14911

ZINC

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Albacora - Atún	*	0,296667	0,128308
Albacora - Bagre		-0,0466667	0,128308
Albacora - Bandera	*	0,256667	0,128308
Albacora - Bonito Sierra	*	0,653333	0,128308
Albacora - Cabezudo	*	0,943333	0,128308
Albacora - Camotillo	*	0,713333	0,128308
Albacora - Carita		0,0233333	0,128308
Albacora - Cherna	*	1,48333	0,128308
Albacora - Corvina	*	0,57	0,128308
Albacora - Dorado	*	0,24	0,128308
Albacora - Guaba		-0,0966667	0,128308
Albacora - Lechuza	*	0,93	0,128308
Albacora - Lisa	*	0,91	0,128308
Albacora - Murico	*	0,756667	0,128308
Albacora - Pargo	*	0,296667	0,128308
Albacora - Perela	*	0,41	0,128308
Albacora - Picudo	*	0,596667	0,128308
Albacora - Sierra		0,0633333	0,128308
Albacora - Tiburón	*	0,79	0,128308
Albacora - Wahoo	*	0,893333	0,128308
Atún - Bagre	*	-0,343333	0,128308
Atún - Bandera		-0,04	0,128308
Atún - Bonito Sierra	*	0,356667	0,128308
Atún - Cabezudo	*	0,646667	0,128308
Atún - Camotillo	*	0,416667	0,128308
Atún - Carita	*	-0,273333	0,128308

Atún - Cherna	*	1,18667	0,128308
Atún - Corvina	*	0,273333	0,128308
Atún - Dorado		-0,0566667	0,128308
Atún - Guaba	*	-0,393333	0,128308
Atún - Lechuza	*	0,633333	0,128308
Atún - Lisa	*	0,613333	0,128308
Atún - Murico	*	0,46	0,128308
Atún - Pargo		0,0	0,128308
Atún - Perela		0,113333	0,128308
Atún - Picudo	*	0,3	0,128308
Atún - Sierra	*	-0,233333	0,128308
Atún - Tiburón	*	0,493333	0,128308
Atún - Wahoo	*	0,596667	0,128308
Bagre - Bandera	*	0,303333	0,128308
Bagre - Bonito Sierra	*	0,7	0,128308
Bagre - Cabezudo	*	0,99	0,128308
Bagre - Camotillo	*	0,76	0,128308
Bagre - Carita		0,07	0,128308
Bagre - Cherna	*	1,53	0,128308
Bagre - Corvina	*	0,616667	0,128308
Bagre - Dorado	*	0,286667	0,128308
Bagre - Guaba		-0,05	0,128308
Bagre - Lechuza	*	0,976667	0,128308
Bagre - Lisa	*	0,956667	0,128308
Bagre - Murico	*	0,803333	0,128308
Bagre - Pargo	*	0,343333	0,128308
Bagre - Perela	*	0,456667	0,128308
Bagre - Picudo	*	0,643333	0,128308
Bagre - Sierra		0,11	0,128308
Bagre - Tiburón	*	0,836667	0,128308
Bagre - Wahoo	*	0,94	0,128308
Bandera - Bonito Sierra	*	0,396667	0,128308
Bandera - Cabezudo	*	0,686667	0,128308
Bandera - Camotillo	*	0,456667	0,128308
Bandera - Carita	*	-0,233333	0,128308
Bandera - Cherna	*	1,22667	0,128308
Bandera - Corvina	*	0,313333	0,128308
Bandera - Dorado		-0,0166667	0,128308
Bandera - Guaba	*	-0,353333	0,128308
Bandera - Lechuza	*	0,673333	0,128308
Bandera - Lisa	*	0,653333	0,128308
Bandera - Murico	*	0,5	0,128308
Bandera - Pargo		0,04	0,128308
Bandera - Perela	*	0,153333	0,128308
Bandera - Picudo	*	0,34	0,128308
Bandera - Sierra	*	-0,193333	0,128308
Bandera - Tiburón	*	0,533333	0,128308
Bandera - Wahoo	*	0,636667	0,128308
Bonito Sierra - Cabezudo	*	0,29	0,128308
Bonito Sierra - Camotillo		0,06	0,128308
Bonito Sierra - Carita	*	-0,63	0,128308
Bonito Sierra - Cherna	*	0,83	0,128308
Bonito Sierra - Corvina		-0,0833333	0,128308
Bonito Sierra - Dorado	*	-0,413333	0,128308
Bonito Sierra - Guaba	*	-0,75	0,128308
Bonito Sierra - Lechuza	*	0,276667	0,128308
Bonito Sierra - Lisa	*	0,256667	0,128308
Bonito Sierra - Murico		0,103333	0,128308
Bonito Sierra - Pargo	*	-0,356667	0,128308
Bonito Sierra - Perela	*	-0,243333	0,128308
Bonito Sierra - Picudo		-0,0566667	0,128308
Bonito Sierra - Sierra	*	-0,59	0,128308
Bonito Sierra - Tiburón	*	0,136667	0,128308

Bonito Sierra - Wahoo	*	0,24	0,128308
Cabezudo - Camotillo	*	-0,23	0,128308
Cabezudo - Carita	*	-0,92	0,128308
Cabezudo - Cherna	*	0,54	0,128308
Cabezudo - Corvina	*	-0,373333	0,128308
Cabezudo - Dorado	*	-0,703333	0,128308
Cabezudo - Guaba	*	-1,04	0,128308
Cabezudo - Lechuza		-0,0133333	0,128308
Cabezudo - Lisa		-0,0333333	0,128308
Cabezudo - Murico	*	-0,186667	0,128308
Cabezudo - Pargo	*	-0,646667	0,128308
Cabezudo - Perela	*	-0,533333	0,128308
Cabezudo - Picudo	*	-0,346667	0,128308
Cabezudo - Sierra	*	-0,88	0,128308
Cabezudo - Tiburón	*	-0,153333	0,128308
Cabezudo - Wahoo		-0,05	0,128308
Camotillo - Carita	*	-0,69	0,128308
Camotillo - Cherna	*	0,77	0,128308
Camotillo - Corvina	*	-0,143333	0,128308
Camotillo - Dorado	*	-0,473333	0,128308
Camotillo - Guaba	*	-0,81	0,128308
Camotillo - Lechuza	*	0,216667	0,128308
Camotillo - Lisa	*	0,196667	0,128308
Camotillo - Murico		0,0433333	0,128308
Camotillo - Pargo	*	-0,416667	0,128308
Camotillo - Perela	*	-0,303333	0,128308
Camotillo - Picudo		-0,116667	0,128308
Camotillo - Sierra	*	-0,65	0,128308
Camotillo - Tiburón		0,0766667	0,128308
Camotillo - Wahoo	*	0,18	0,128308
Carita - Cherna	*	1,46	0,128308
Carita - Corvina	*	0,546667	0,128308
Carita - Dorado	*	0,216667	0,128308
Carita - Guaba		-0,12	0,128308
Carita - Lechuza	*	0,906667	0,128308
Carita - Lisa	*	0,886667	0,128308
Carita - Murico	*	0,733333	0,128308
Carita - Pargo	*	0,273333	0,128308
Carita - Perela	*	0,386667	0,128308
Carita - Picudo	*	0,573333	0,128308
Carita - Sierra		0,04	0,128308
Carita - Tiburón	*	0,766667	0,128308
Carita - Wahoo	*	0,87	0,128308
Cherna - Corvina	*	-0,913333	0,128308
Cherna - Dorado	*	-1,24333	0,128308
Cherna - Guaba	*	-1,58	0,128308
Cherna - Lechuza	*	-0,553333	0,128308
Cherna - Lisa	*	-0,573333	0,128308
Cherna - Murico	*	-0,726667	0,128308
Cherna - Pargo	*	-1,18667	0,128308
Cherna - Perela	*	-1,07333	0,128308
Cherna - Picudo	*	-0,886667	0,128308
Cherna - Sierra	*	-1,42	0,128308
Cherna - Tiburón	*	-0,693333	0,128308
Cherna - Wahoo	*	-0,59	0,128308
Corvina - Dorado	*	-0,33	0,128308
Corvina - Guaba	*	-0,666667	0,128308
Corvina - Lechuza	*	0,36	0,128308
Corvina - Lisa	*	0,34	0,128308
Corvina - Murico	*	0,186667	0,128308
Corvina - Pargo	*	-0,273333	0,128308
Corvina - Perela	*	-0,16	0,128308
Corvina - Picudo		0,0266667	0,128308

Corvina - Sierra	*	-0,506667	0,128308
Corvina - Tiburón	*	0,22	0,128308
Corvina - Wahoo	*	0,323333	0,128308
Dorado - Guaba	*	-0,336667	0,128308
Dorado - Lechuza	*	0,69	0,128308
Dorado - Lisa	*	0,67	0,128308
Dorado - Murico	*	0,516667	0,128308
Dorado - Pargo		0,0566667	0,128308
Dorado - Perela	*	0,17	0,128308
Dorado - Picudo	*	0,356667	0,128308
Dorado - Sierra	*	-0,176667	0,128308
Dorado - Tiburón	*	0,55	0,128308
Dorado - Wahoo	*	0,653333	0,128308
Guaba - Lechuza	*	1,02667	0,128308
Guaba - Lisa	*	1,00667	0,128308
Guaba - Murico	*	0,853333	0,128308
Guaba - Pargo	*	0,393333	0,128308
Guaba - Perela	*	0,506667	0,128308
Guaba - Picudo	*	0,693333	0,128308
Guaba - Sierra	*	0,16	0,128308
Guaba - Tiburón	*	0,886667	0,128308
Guaba - Wahoo	*	0,99	0,128308
Lechuza - Lisa		-0,02	0,128308
Lechuza - Murico	*	-0,173333	0,128308
Lechuza - Pargo	*	-0,633333	0,128308
Lechuza - Perela	*	-0,52	0,128308
Lechuza - Picudo	*	-0,333333	0,128308
Lechuza - Sierra	*	-0,866667	0,128308
Lechuza - Tiburón	*	-0,14	0,128308
Lechuza - Wahoo		-0,0366667	0,128308
Lisa - Murico	*	-0,153333	0,128308
Lisa - Pargo	*	-0,613333	0,128308
Lisa - Perela	*	-0,5	0,128308
Lisa - Picudo	*	-0,313333	0,128308
Lisa - Sierra	*	-0,846667	0,128308
Lisa - Tiburón		-0,12	0,128308
Lisa - Wahoo		-0,0166667	0,128308
Murico - Pargo	*	-0,46	0,128308
Murico - Perela	*	-0,346667	0,128308
Murico - Picudo	*	-0,16	0,128308
Murico - Sierra	*	-0,693333	0,128308
Murico - Tiburón		0,0333333	0,128308
Murico - Wahoo	*	0,136667	0,128308
Pargo - Perela		0,113333	0,128308
Pargo - Picudo	*	0,3	0,128308
Pargo - Sierra	*	-0,233333	0,128308
Pargo - Tiburón	*	0,493333	0,128308
Pargo - Wahoo	*	0,596667	0,128308
Perela - Picudo	*	0,186667	0,128308
Perela - Sierra	*	-0,346667	0,128308
Perela - Tiburón	*	0,38	0,128308
Perela - Wahoo	*	0,483333	0,128308
Picudo - Sierra	*	-0,533333	0,128308
Picudo - Tiburón	*	0,193333	0,128308
Picudo - Wahoo	*	0,296667	0,128308
Sierra - Tiburón	*	0,726667	0,128308
Sierra - Wahoo	*	0,83	0,128308
Tiburón - Wahoo		0,103333	0,128308

Sig.: Se coloca un asterisco si existe una diferencia significativa.

ANEXO 2: MÉTODO AOAC UTILIZADO

C. Preparation of Standard Solutions

(a) *Copper standard solution.*—1000 µg/mL. Dissolve 1.000 g 99.99% Cu in 20 mL HNO₃, cool, and dilute to 1 L with H₂O.

(b) *Nickel standard solution.*—1000 µg/mL. Dissolve 1.000 g 99.99% Ni in 20 mL HNO₃, cool, and dilute to 1 L with H₂O.

(c) *Matrix standard solutions.*—Prepare solutions containing 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.0, 4.0, 8.0, and 10 µg Ni and Cu/mL and major metal matrix components: (1) *For 3 g sample tea.*—To contain 180 µg Ca, 100 µg Mg, and 40 µg Al/mL with final concentration of 8% (v/v) HClO₄. (2) *For 6 g sample instant tea.*—To contain 7000 µg K, 70 µg Na, 700 µg Mg, and 130 µg Ca/mL with final HNO₃ concentration of (1 + 9).

D. Preparation of Calibration Curve

Let instrument stabilize. Optimize conditions for Cu or Ni according to manufacturer's instructions.

Aspirate 10 µg/mL standard enough times to establish that *A* reading is not drifting. Record 6 readings and calculate standard deviation (σ) = $(x - y) \times 0.40$, where *x* and *y* are maximum and minimum readings, respectively, and 0.40 is factor to convert range of 6 values to σ .

Beginning with solution containing 0 Cu, aspirate each matrix standard solution and record *A*. If value for 10 µg/mL solution differs from average of the 6 values used to calculate σ by $>0.01 \times$ (average of the 6 values), repeat measurements. If these determinations indicate drift, determine cause (e.g., deposits in burner or clogged capillary), correct it, and repeat calibration. Repeat for Ni solutions. Plot *A* against µg metal/mL.

E. Determination

Select test portion weight to give solution containing ≥ 0.05 but ≤ 10 µg Ni/mL, usually 3 g for teas and 6 g for instant teas.

(a) *Wet ashing.*—Accurately weigh test portion into 400 mL beaker, add 100 mL HNO₃, and swirl. Cover, and let react 10 min; then place on hot plate. Evaporate to near dryness and cool. Add 50 mL HNO₃, and for tea, add 10 mL HClO₄. Continue evaporation to obtain clear solution.

Transfer to 50 mL volumetric flask and dilute to volume with H₂O. (Insoluble KClO₄ which settles to bottom of flask does not interfere.)

Prepare reagent blank containing same amounts of acids taken from same lots, evaporated as above.

(b) *Photometry.*—Aspirate test and blank solutions, and record *A*. Measure *A* of matrix standard solution containing 10 µg/mL. If this value differs from value of average of the 6 values used to calculate σ by $>2\sigma$, repeat measurement. If these values indicate drift, determine cause, correct it, and repeat calibration and test and blank readings.

(c) *Calculations.*—Correct readings of test solution for blank. Convert corrected *A* to µg/mL from calibration curve.

$$\text{Concentration (mg/kg) Ni (or Cu)} = \frac{C \times V}{W}$$

where *C* = µg metal/mL from curve, *V* = final volume test solution (50), and *W* = g test portion.

References: *JAOAC* 53, 531(1970); 54, 658(1971).

CAS-7440-50-8 (copper)

CAS-7440-02-0 (nickel)

9.1.08

AOAC Official Method 999.10 Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods

Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion

First Action 1999

[Applicable to determination of Zn, Cu, and Fe in a variety of foods by microwave digestion and flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS), and Cd and Pb by microwave digestion and graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS). Method is capable of determining these elements at concentrations above approximately Pb (0.1), Cd (0.01), Zn (4), Cu (0.2), and Fe (7) mg/kg. Method is not applicable to foods with a fat content $\geq 40\%$. Not applicable to milk powder. See Table 999.10A for the results of the interlaboratory study supporting the acceptance of the method.]

Caution: Digestion vessels must cool for an appropriate time before opening in order to avoid burns from hot and corrosive vapors. Always gently add acid to water. Maintain safe distance from furnaces equipped with Zeeman background correction when the magnet is on. Consult manufacturer's instructions to determine safe distance, which varies for different instruments. See Appendix B, Laboratory Safety, for safe use of compressed gases, inorganic acids, and atomic absorption spectrometer. For disposal of 4% acetic acid solutions, follow local regulations.

A. Principle

Products are digested with HNO₃ and H₂O₂ under pressure in a closed vessel heated by microwaves. Solution is diluted with H₂O. Pb and Cd are determined by GFAAS. Zn, Cu, and Fe are determined by FAAS.

B. Apparatus

(a) *Atomic absorption spectrophotometer.*—With air-acetylene burner or nitrous oxide-acetylene burner for flame (FAAS; see Table 999.10B) and a graphite furnace for electrothermal (GFAAS; see Table 999.10C) determinations, with appropriate background (nonatomic) correction.

(b) *Hollow cathode or electrodeless discharge lamps.*—For Pb, Cd, Zn, Cu, and Fe.

(c) *Microwave oven.*—Designed for laboratory use, e.g., MDS-2000, CEM Corp., PO Box 200, Matthews, NC 28106-2000 USA. Microwave oven should be regularly checked for delivered power. If the measured effect does not agree with the specification, adjust the program: Fill a plastic beaker (polypropylene or Teflon) with 1.000 kg water (room temperature) and measure temperature (*T*_b). Place beaker in microwave oven and heat water at full power for 2 min. Take beaker out of oven, stir water, and measure temperature (*T*_a). The delivered power in watts:

$$P = 35 \times (T_a - T_b)$$

(d) *Teflon digestion vessels.*—100 mL, withstanding a pressure of at least 1.4 MPa.

(e) *Volumetric flasks.*—25 and 1000 mL.

(f) *Funnels.*—Glass or plastic.

Table 999.10A Interlaboratory study results

Metal	Sample	Analyte range, mg/kg	Mean, mg/kg	n ^a	Outliers	s _r	s _R	RSD _r , %	RSD _R , %	r	R
Pb (GFAAS)	Liver	≥0.1	0.130	11	1	0.049	0.055	37	42	0.14	0.15
	Wheat bran		0.155	12	0	0.088	0.091	57	59	0.25	0.26
	Diets ^b		0.394	12	0	0.063	0.098	16	25	0.18	0.27
	Bovine muscle		0.398	10	2		0.086		22		0.24
	Fish		0.48	12	0		0.13		27		0.36
	Mushroom		1.62	12	0		0.26		16		0.73
Cd (GFAAS)	Bovine muscle	≥0.01	0.0124	12	1		0.0034		28		0.0097
	Liver		0.164	13	0	0.025	0.034	15	20	0.070	0.094
	Wheat bran		0.171	11	2	0.0078	0.022	4.6	13	0.022	0.063
	Fish		0.211	12	0		0.035		17		0.099
	Mushroom		0.482	11	2		0.053		11		0.149
	Diets ^b		0.764	12	1	0.050	0.105	6.5	14	0.14	0.294
Zn (FAAS)	Fish	≥4	4.50	12	0		0.41		9.1		1.1
	Milk powder		35.3	14	0		3.3		9.3		9.1
	Diets ^b		47.8	13	1	1.9	2.5	4.0	5.3	5.4	7.1
	Mushroom		56.9	14	0		3.0		5.3		8.4
	Wheat bran		73.5	13	1	2.5	3.5	3.4	4.8	7.1	9.9
	Bovine muscle		147.3	11	3		2.5		1.7		7.0
Cu (FAAS)	Liver		181.9	12	2	2.8	8.8	1.6	4.8	7.9	25
	Fish	≥0.2	0.241	4	0		0.094		39		0.26
	Bovine muscle		2.63	6	0		0.17		6.4		0.47
	Wheat bran		10.14	10	1	0.44	0.81	4.3	7.9	1.2	2.3
	Mushroom		37.7	14	0		2.2		5.7		6.0
	Diets ^b		63.42	12	2	0.95	1.0	1.5	3.0	2.7	5.3
Fe (FAAS)	Liver		107.5	14	0	3.3	4.1	3.1	3.8	9.3	12
	Fish	≥7	7.4	9	0		1.3		17		3.5
	Bovine muscle		75.0	12	0		8.1		11		23
	Mushroom		105.5	11	0		7.9		7.5		22
	Wheat bran		123.1	12	0	3.9	9.9	3.2	8.1	11	28
	Diets ^b		303	10	2	12	18	4.0	5.9	33	50
	Liver		487	12	0	27	31	5.4	6.4	74	88

^a n = Number of laboratories after outlier elimination. Values for s_r, RSD_r, and r are only available for duplicate or split level determinations.

^b Simulated diets E and F.

(g) *Plastic bottles*.—e.g., Polystyrene bottles with tightly fitting lids, 50–100 mL.

(h) *Drying oven*.—Or equipment for freeze-drying.

All glassware and plasticware should be carefully cleaned and rinsed, e.g., with HNO₃ or HCl, in order to avoid metal contamination.

C. Reagents

Reagents should be of at least analytical reagent grade (p.a.), preferably ultrapure (suprapur) or equivalent.

(a) *Water*.—Redistilled or deionized, ≥18 MΩ·cm.

(b) *Nitric acid*.—65% (w/w).

(c) *Nitric acid*.—0.1M. Dilute 7 mL concentrated HNO₃, (b), with water to 1 L.

(d) *Nitric acid*.—3M. Dilute 200 mL concentrated HNO₃, (b), with water to 1 L.

(e) *Hydrogen peroxide*.—30% (w/w).

(f) *Zinc standard solution*.—1 mg/l. Dissolve 1.000 g Zn in 14 mL water + 7 mL nitric acid, (b), in 1 L volumetric flask. Dilute to volume with water. [Note: Commercially available standard solutions for AAS (e.g., BDH Chemicals Ltd., Poole, UK) may be used for all metal standard solutions.]

(g) *Copper standard solution*.—1 mg/mL. Dissolve 1.000 g Cu in 7 mL nitric acid, (b), in 1 L volumetric flask. Dilute to volume with water.

(h) *Iron standard solution*.—1 mg/mL. Dissolve 1.000 g Fe in 14 mL water + 7 mL nitric acid, (b), in 1 L volumetric flask. Dilute to volume with water.

(i) *Lead standard solution*.—1 mg/mL. Dissolve 1.000 g Pb in 7 mL HNO₃, (b), in 1 L volumetric flask and dilute to volume with water.

Table 999.10B Instrumental parameters for FAAS

Metal	Flame type	Wavelength, nm
Zn	Air-acetylene, oxidizing	213.9
Cu	Air-acetylene, oxidizing	324.7
Fe	Air-acetylene, oxidizing	248.3
Fe	N ₂ O-acetylene, oxidizing	248.3

(j) *Cadmium standard solution.*—1 mg/mL. Dissolve 1.000 mg Cd in 14 mL water + 7 mL HNO₃, (b), in 1 L volumetric flask and dilute to volume with water.

(k) *Working standard solutions.*—(1) *For flame analysis.*—Dilute standard, (f)–(j), with 0.1M HNO₃, (c), to a range of standards that covers the concentration of the element to be determined. (2) *For graphite furnace analysis.*—Dilute standard solutions, (f)–(j), with 0.1M HNO₃, (c), to a range of standards that covers the linear range of the element to be determined.

D. Procedures

(a) *Cleaning procedure.*—(1) *For glass and plasticware.*—Acid solution: 500 mL concentrated HNO₃, C(b), + 4500 mL deionized water, C(a). Wash first with water and detergent. Rinse with tap water, followed by deionized water, then with acid solution. Finally rinse 4–5 times with deionized water. (2) *For Teflon digestion vessels.*—Rinse with acetone, wash with deionized water, keep vessels covered with 0.1M HNO₃, C(c), for at least 30 min, rinse with deionized water, and let vessels dry.

Use separate vessels for different applications, depending on the concentration of metals. If, however, the same digestion vessels are used for heavily contaminated products, e.g., sludge, it may be necessary to use a more severe cleaning procedure, e.g., heating vessels together with concentrated HNO₃, C(b). The instrument manual usually provides detailed instructions for such cleaning procedures.

(b) *Pre-treatment.*—If product is to be analyzed fresh, proceed to (d), *Homogenization*. Otherwise, continue at (c), *Drying*.

(c) *Drying.*—Dry to constant weight in drying oven at 105°C, or freeze-dry. Freeze-drying is usually preferable because it renders the product less compact and easier to homogenize. If final result is based on fresh weight, weigh test portion before and after drying to obtain water content:

$$H_2O = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100$$

where H₂O, % = water content of the test portion (%); W_f = weight of the test portion (g); W_d = weight after drying (g).

(d) *Homogenization.*—Homogenize products using noncontaminating equipment. Check for leached metals if the apparatus consists of metal parts.

(e) *Digestion.*—Weigh 0.2–0.5 g dry material into digestion vessel. If water-containing materials are used, maximum weight is restricted to 2 g, but dry matter content must never exceed 0.5 g. For example, if product has a water content of 50%, take a maximum of 1 g (=0.5 g dry matter). If a product has a water content of 95%, take 2 g (<0.5 g dry matter). When unknown products are digested, too much solids may cause the safety membrane in the digestion vessel to rupture.

Add 5 mL HNO₃, C(b), and 2 mL 30% H₂O₂, C(e). Close vessels, place vessels in holder, place vessel holder in microwave oven, and close door. Set oven program according to the parameters given in Table 3 and start program.

The program is valid only when 12 vessels are being digested simultaneously. If fewer are being digested, the remaining vessels must be filled with reagent blank. When a microwave oven other than the one given as an example is used, it may be necessary to use a slightly different time/power program.

Remove digestion vessels from microwave oven and let cool thoroughly before opening them. Open vessel and rinse down lid and walls into container. Transfer solution to 25 mL volumetric flask and dilute to mark with deionized water. Then, transfer solution to plastic container. Treat blanks in the same way as tests. One blank should be included in every set.

(f) *Dilution.*—If test solution needs to be further diluted (due to high metal concentrations), dilute with 3M HNO₃, C(d), in order to maintain same acid concentration prior to metal determination, (g).

High acid concentration is environmentally undesirable and may depress the analytical signal. Reduce acid strength by diluting the test solution 1/2 with 0.1M nitric acid and standard solutions 1/2 with 3M nitric acid. The tests and standards are thereby brought to the same acid concentration. Matching of acid concentrations is important when a calibration curve is used.

(g) *Atomic absorption spectrophotometry.*—Use of flame or graphite furnace technique is determined by the concentration of the metal to be determined. Flame technique should be used as far as possible, since this technique is less sensitive to interference than the GFAAS. The most appropriate wavelength, gas mixture/temperature program, and other instrumental parameters for each metal are found in the manual provided with the instrument. Always use background correction.

Measurements must be within the linear range when the method of standard addition is used. A standard addition curve consists of at least 3 points, of which at least 2 are standards. The concentration of the highest standard should be 3–5 times the concentration in the test solution. The lower standard should have a concentration approximately half of the highest standard. A simplified version of the method of standard addition is to use a matrix-matched standard curve, which is applicable to products with the same matrix: The test and standard solutions are mixed and used to make a standard addition curve. This curve is then parallel transferred to origin and is used as the standard curve for the tests that followed and that have been diluted in the same proportions. The matrix-matched standard curve and the test solutions will thus have the same matrix concentration. On most modern instruments, this function is included in the software.

(1) *Flame technique.*—The concentration of Zn, Cu, and Fe are usually at levels suitable for determination by FAAS. When calibration curve is to be used, standards and test solutions must have the same acid concentration.

Table 999.10C Instrumental parameters for GFAAS

Metal	Wavelength, nm	Temperature (°C)/ramp-hold (s)		Cleaning out step (°C)
		Ashing step	Atomization step	
Pb	283.3	650/15-10	1900/0-4	2500
Cd	228.8	350/15-10	1200/0-4	2500

Table 999.10D Parameters for microwave oven program

Step	Power (watts)	Duration (min)
1	250	3
2	630	5
3	500	22
4	0	15

Since Fe may be strongly affected by interferences from the matrix, use either the method of standard addition or matrix-matched standards. When experiencing severe interferences, an oxidizing nitrous oxide acetylene flame may be an alternative.

(2) *Graphite furnace technique.*—This technique is generally required for determination of Pb and Cd in foods. Use pyrolytically coated tubes with platforms. Since the method results in a fairly large dilution of the analyte, it may frequently be needed also for the determination of, e.g., Cu. The method of standard addition or matrix-matched standards should always be used unless shown to be unnecessary (i.e., no significant difference between the slopes of calibration curves of pure working standard and standard addition curves of the test product). Measurements must be made in the linear range when the method of addition is used.

Program the autosampler to deliver a volume that gives as large an absorbance as possible within the linear range and producing a background absorbance not larger than approximately 0.5 absorbance units. Multiple injection may enhance the absorbance at very low concentrations. Evaluate each new matrix by means of ash- and atomization-curves in order to optimize the graphite furnace parameters.

E. Calculations and Evaluation of Results

Calculate the concentration (C) of metal in the test sample according to the formula:

$$C = \frac{(a - b)df \times 25}{m}$$

where C = concentration in the test sample (mg/kg); a = concentration in the test solutions (mg/L); df = dilution factor; b = mean concentration in the blank solutions (mg/L); m = weight of the test portion (g).

If (a - b) is lower than the detection limit, DL, then (a - b) is replaced by DL for calculation of the limit of detection in the test sample.

If the test solution has been diluted, the dilution factor (df) has to be taken into account. If the test portion was dried and the result should be based on fresh weight, correct according to the following:

$$C_{FW} = C \times \frac{100 - H_2O\%}{100}$$

where C_{FW} = concentration in the test portion corrected to fresh weight (mg/kg); $H_2O\%$ = the water content of the test portion (%).

When running replicates, the average of the results should be given with 3 significant figures.

Detection limit.—The DL for each metal is calculated as $DL = 3 \times$ standard deviation of the mean of the blank determinations ($n = \geq 20$). A large number of blanks must be analyzed before DL can be

established. A DL is not static and will need to be re-evaluated from time to time in accordance with changes in the blank levels.

Reference: *J. AOAC Int.* (future issue).

9.1.09

AOAC Official Method 999.11 Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods

Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing First Action 1999

[Applicable to the determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in food by dry ashing and flame atomic absorption spectrometry (GFAAS), flame and graphite furnace procedures. See Table 999.11A for the results of the interlaboratory study supporting the acceptance of the method.]

Caution: Always gently add acid to water.

Avoid environmental contamination by Pb. Store quartz crucibles in 20% HNO_3 and rinse with deionized water before use. When necessary, crucibles may be boiled with 20% HNO_3 before use. Heat platinum crucibles until red hot and boil with 50% (v/v) HCl prior to use.

Ash products with a high fat content ($\geq 40\%$), e.g., margarine or lard, with great care to avoid self-ignition. Pre-ash such products according to D(c)(2), even if a programmable furnace is used.

A. Principle

Test portions are dried and then ashed at 450°C under a gradual increase ($\leq 50^\circ C/h$) in temperature. 6M HCl (1 + 1) is added, and the solution is evaporated to dryness. The residue is dissolved in 0.1M HNO_3 , and the analytes are determined by flame and graphite procedures.

B. Apparatus

(a) *Atomic absorption spectrophotometer.*—With an air-acetylene burner or nitrous oxide-acetylene burner for flame and a graphite furnace for electrothermal determinations, with appropriate background (nonatomic) correction (see Table 999.11B).

See Table 999.11C for example of instrumental parameters for graphite furnace AAS. (The parameters listed are for a Perkin Elmer HGA-500 instrument. For other instruments, the parameters may have to be changed. Suitable parameters are usually given in the manual provided with the instrument.)

(b) *Hollow cathode, or electrodeless discharge lamps for all elements determined.*

(c) *Furnace.*—Programmable, or muffle furnace with thermostat maintaining $450 \pm 25^\circ C$. If muffle furnace is used, a separate pre-ashing device is required. See (d)–(h).

(d) *Hot plate.*—With heating control, to heat up to about 300°C.

(e) *Lamp.*—IR 250 W, fixed to a retort stand in a way that allows adjustment of the distance to the plate.

(f) *Ceramic plate.*—e.g., Desiccator plate on a low stand, with a diameter that suits the hot plate.


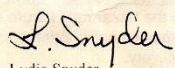
(g) *Glass cover.*—e.g., Crystallizing dish, 185 mm diameter, 100 mm height, to fit on (f) or equivalent.

ANEXO 3: CÁLCULOS DE RECUPERACIÓN PARA HIERRO Y ZINC

Hierro	Replica	Fortificación (mg/L)	Muestra (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	M sin forti. (mg/L)	Resta	%R	Criterio de aceptación	Media %R
Semana 1	1	0,013	0,5010	0,091	1,82	0,07893	0,012	96,21	80-110%	99,20
	2	0,013	0,5006	0,092	1,84	0,07886	0,013	104,68		
	3	0,013	0,5006	0,091	1,82	0,07886	0,012	96,72		
	1	0,240	0,5056	0,319	6,31	0,07965	0,239	99,73		98,09
	2	0,240	0,5002	0,318	6,36	0,07880	0,239	99,67		
	3	0,240	0,5036	0,307	6,10	0,07933	0,228	94,86		
	1	0,660	0,5148	0,717	13,93	0,08110	0,636	96,35		95,05
	2	0,660	0,5026	0,701	13,95	0,07918	0,622	94,22		
	3	0,660	0,5001	0,703	14,06	0,07878	0,624	94,58		
Semana 2	1	0,013	0,5096	0,089	1,75	0,07597	0,013	103,80	80-110%	99,12
	2	0,013	0,5108	0,088	1,72	0,07615	0,012	94,41		
	3	0,013	0,5001	0,087	1,74	0,07456	0,012	99,15		
	1	0,240	0,5017	0,304	6,06	0,07479	0,229	95,50		95,50
	2	0,240	0,5003	0,302	6,04	0,07459	0,227	94,76		
	3	0,240	0,5034	0,306	6,08	0,07505	0,231	96,23		
	1	0,660	0,5214	0,691	13,25	0,07773	0,613	92,92		93,47
	2	0,660	0,5234	0,699	13,35	0,07803	0,621	94,09		
	3	0,660	0,5071	0,692	13,65	0,07560	0,616	93,39		
Semana 3	1	0,013	0,5001	0,080	1,60	0,06843	0,012	92,16	80-110%	93,48
	2	0,013	0,5070	0,081	1,60	0,06938	0,012	92,60		
	3	0,013	0,5188	0,083	1,60	0,07099	0,012	95,67		
	1	0,240	0,5038	0,300	5,95	0,06894	0,231	96,27		97,15
	2	0,240	0,5213	0,307	5,89	0,07134	0,236	98,19		
	3	0,240	0,5207	0,304	5,84	0,07125	0,233	96,98		
	1	0,660	0,5069	0,718	14,16	0,06936	0,649	98,28		98,63
	2	0,660	0,5046	0,720	14,27	0,06905	0,651	98,63		
	3	0,660	0,5097	0,723	14,18	0,06975	0,653	98,98		

Zinc	Réplica	Fortificación (mg/L)	Muestra (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	M sin forti. (mg/L)	Resta	%R	Criterio de aceptación	Media %R
Semana 1	1	0,013	0,5001	0,111	2,22	0,09885	0,012	96,06	80-110%	95,90
	2	0,013	0,5070	0,112	2,21	0,10021	0,012	93,19		
	3	0,013	0,5188	0,115	2,22	0,10254	0,012	98,46		
	1	0,175	0,5038	0,262	5,20	0,09958	0,162	92,81		94,18
	2	0,175	0,5213	0,273	5,24	0,10304	0,170	97,12		
	3	0,175	0,5207	0,265	5,09	0,10292	0,162	92,62		
	1	0,400	0,5069	0,496	9,78	0,10019	0,396	98,95		99,44
	2	0,400	0,5046	0,498	9,87	0,09974	0,398	99,57		
	3	0,400	0,5097	0,500	9,81	0,10075	0,399	99,81		
Zinc	Réplica	Fortificación (mg/L)	Muestra (g)	C (mg/L)	C (mg/100g)	M sin forti. (mg/L)	Resta	%R	Criterio de aceptación	Media %R
Semana 2	1	0,013	0,5096	0,107	2,10	0,09469	0,012	97,34	80-110%	96,14
	2	0,013	0,5108	0,107	2,09	0,09491	0,012	95,58		
	3	0,013	0,5001	0,105	2,10	0,09292	0,012	95,49		
	1	0,175	0,5017	0,252	5,02	0,09322	0,159	90,73		90,53
	2	0,175	0,5003	0,251	5,02	0,09296	0,158	90,31		
	3	0,175	0,5034	0,252	5,01	0,09353	0,158	90,55		
	1	0,400	0,5214	0,484	9,28	0,09688	0,387	96,78		97,05
	2	0,400	0,5234	0,483	9,23	0,09725	0,386	96,44		
	3	0,400	0,5071	0,486	9,58	0,09422	0,392	97,94		
Semana 3	1	0,013	0,5060	0,119	2,35	0,10761	0,011	90,03	80-110%	91,88
	2	0,013	0,5045	0,119	2,36	0,10729	0,012	92,56		
	3	0,013	0,5089	0,120	2,36	0,10823	0,012	93,06		
	1	0,175	0,5022	0,280	5,58	0,10680	0,173	98,97		97,88
	2	0,175	0,5113	0,279	5,46	0,10874	0,170	97,29		
	3	0,175	0,5012	0,277	5,53	0,10659	0,170	97,38		
	1	0,400	0,5052	0,502	9,94	0,10744	0,395	98,64		98,09
	2	0,400	0,5137	0,500	9,73	0,10925	0,391	97,69		
	3	0,400	0,5040	0,499	9,90	0,10719	0,392	97,95		

ANEXO 4: CERTIFICADOS DE ESTÁNDARES UTILIZADOS

125 Market Street New Haven, CT 06513 USA	 AccuStandard® Inc.	Tel (203)786-5290 Fax (203)786-5287 www.AccuStandard.com
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
AccuTrace™ Reference Standard		
Item Number: AA70N-1		
Element: Zinc	Lot: 211025060	
Storage Condition: Ambient	Date Certified: 2/28/2011	
Hazards: IRRITANT	Expiration: Feb / 2016	
Matrix: 2-5% Nitric acid	Sample Size: 100 mL	
<input checked="" type="checkbox"/> Included on ISO/IEC 17025 Scope of Accreditation		
<input checked="" type="checkbox"/> Included on ISO Guide 34 Scope of Accreditation		
Actual Lot Analysis		
Zinc 1000 µg/mL		
The gravimetric uncertainty for this product is ±0.24%. The CRM uncertainty is ±5%. See reverse side for details.		
The concentration of the final solution was verified by ICP against NIST SRM# 3168a		
RESULTS: This solution standard was certified for accuracy of major elemental constituency via methodology traceable to primary or well characterized secondary standards. All trace level elements and impurities were determined via plasma emission spectroscopy on the concentrate.		
This standard was prepared gravimetrically to contain the elemental concentrations shown above. Balances, used in the preparation, are calibrated regularly using NIST-traceable weights. All glassware is Class A.		
Use good laboratory procedure when diluting this product. Shake bottle prior to use and do not pipette directly out of the bottle. Use only cleaned Class A volumetric glassware.		
We certify the accuracy of this standard to be ± 0.5% of the stated value until the expiration date listed above, provided it is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.		
For use in routine laboratory analysis.	 Lydia Snyder Inorganic QC Supervisor	
AccuStandard is accredited to ISO Guide 34, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001		
		OR-ORG/INO-001 Rev. 7/11

125 Market Street
New Haven, CT 06513
USA



AccuStandard® Inc.

Tel (203)786-5290
Fax (203)786-5287
www.AccuStandard.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

AccuTrace™ Reference Standard

Item Number: AA27N-1

Element: Iron

Storage Condition: Ambient

Hazards: IRRITANT

Matrix: 2-5% Nitric acid

Lot: 210065173

Date Certified: 7/1/2010

Expiration: Jul / 2015

Sample Size: 100 mL

Included on ISO/IEC 17025 Scope of Accreditation

Included on ISO Guide 34 Scope of Accreditation

Actual Lot Analysis

Iron 1000 µg/mL

The gravimetric uncertainty for this product is $\pm 0.24\%$. The CRM uncertainty is $\pm 5\%$. See reverse side for details.

The concentration of the final solution was verified by ICP against NIST SRM# 3126a

RESULTS: This solution standard was certified for accuracy of major elemental constituency via methodology traceable to primary or well characterized secondary standards. All trace level elements and impurities were determined via plasma emission spectroscopy on the concentrate.

This standard was prepared gravimetrically to contain the elemental concentrations shown above. Balances, used in the preparation, are calibrated regularly using NIST-traceable weights. All glassware is Class A.

Use good laboratory procedure when diluting this product. Shake bottle prior to use and do not pipette directly out of the bottle. Use only cleaned Class A volumetric glassware.

We certify the accuracy of this standard to be $\pm 0.5\%$ of the stated value until the expiration date listed above, provided it is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.

For use in routine laboratory analysis.

Lydia Snyder
Inorganic QC Supervisor

AccuStandard is accredited to ISO Guide 34, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001

OR-ORG/INQ-001
Rev. 7/11

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Gabriela Sofía Betancourt Flores, con CC. 1725358145, autora del trabajo de graduación intitulado: “Determinación de hierro y zinc en diferentes especies de pescados de la costa ecuatoriana por espectrofotometría de absorción atómica de llama.”, previa la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 23 enero de 2017

Gabriela Betancourt

CI. 1725358145