



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**PREPARACIÓN DE UN MATERIAL DE  
REFERENCIA CERTIFICADO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN MÚSCULO  
DE PEZ ALFONSINO (*Beryx splendens* L. 1834)**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

PATROCINANTE

Profesora Julia Vinagre Leiro  
Depto. de Ciencias de los Alimentos y  
Tecnología Química

DIRECTORES

Profesora Julia Vinagre Leiro  
Depto. de Ciencias de los  
Alimentos y Tecnología Química

Señora Nuri Gras Rebolledo  
Sección de Metrología Química,  
Comisión Chilena de Energía Nuclear

PAULA A. LICHTENBERG BAIGORRÍA

Santiago, Chile

NOVIEMBRE 2006

CIRCULACIÓN RESTRINGIDA NOVIEMBRE 2008

## ÍNDICE GENERAL

### **CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES GENERALES**

1. 1.	INTRODUCCIÓN	2.
1.1.1.	Hipótesis	5.
1.1.2	Objetivos	5.
1. 2.	MARCO TEÓRICO	6.
1.2.1.	Alfonsino	7.
1.2.2.	Mercurio	8.
1.2.3.	Materiales de Referencia	11.
1.2.3.a.	Requisitos de un Material de Referencia	14.

### **CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1.	PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE REFERENCIA	17.
2.2.	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD	23.
2.3.	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	24.
2.4.	CUANTIFICACIÓN DEL ANALITO	26.
2.4.1.	Análisis por Activación Neutrónica	26.
2.4.2.	Espectrofotometría de Absorción Atómica	28.
2.5.	DETERMINACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD	32.
2.5.1.	Número de unidades y submuestras a medir	33.
2.5.2	Incertidumbre	33.
2.5.3	Masa de prueba mínima de muestra representativa	36.
2.6.	DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD	37.

---

<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
3.1.	CONTENIDO DE AGUA INICIAL DE LA MATRIZ ALFONSINO	40.
3.2.	CONTENIDO DE HUMEDAD RESIDUAL DEL MRC	41.
3.3.	TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL MRC	42.
3.4.	NÚMERO DE MUESTRAS A MEDIR	44.
3.5.	HOMOGENEIDAD DEL MATERIAL	44.
3.6.	MATERIALES CONTROLES	46.
3.7.	FRACCIÓN DE MASA DEL ANALITO EN BASE SECA	47.
	3.7.1. Fracción de masa del analito en base húmeda	50.
3.8.	MASA DE MUESTRA MÍNIMA REPRESENTATIVA PARA CADA ANÁLISIS	51.
3.9.	TABLA RESUMEN DE RESULTADOS	53.
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	
4.1	CONCLUSIONES	55.
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>REFERENCIAS</b>	
5.1	REFERENCIAS	58.

---

<b>CAPÍTULO 6</b>		<b>ANEXOS</b>	
Anexo 1	Campos de la Metrología		63.
Anexo 2	Cadena de Trazabilidad		64.
Anexo 3	Definiciones		65.
Anexo 4	Pez Alfonsino		68.
	◦ Información Nutricional		68.
	◦ Desembarques anuales de Alfonsino de 1997- 2005		69.
	◦ Desembarques mensuales de Alfonsino		69.
	◦ Producción de Alfonsino 2000 – 2002		70.
	◦ Exportación de Alfonsino 2003		70.
Anexo 5	Mercurio		71.
	◦ Ingreso del Me-Hg <sup>+</sup> al ambiente		71.
	◦ Movimiento del Me-Hg <sup>+</sup> en la cadena trófica		71.
	◦ Niveles de referencia de Me-Hg <sup>+</sup> en peces según Codex Alimentarius		72.
	◦ Riesgo de Contaminación con mercurio en diversos peces		72.
	◦ Cálculo del Mercurio ingerido al consumir pescado		73.
	◦ Referencia RSA con respecto al contenido de Hg		73.
	◦ Recomendaciones EPA y FDA para el consumo de pescado		73.

---

Anexo 6	Preparación candidato a MRC-Alfonsino	74.
◦	Primera molienda de Alfonsino	74.
◦	Liofilizador	74.
◦	Alfonsino liofilizado	74.
◦	Mortero Planetario	75.
◦	Alfonsino Tamizado	75.
◦	Homogenizador	75.
◦	Enfrascado del Material	76.
◦	Cápsulas para AAN con polvo seco de Alfonsino	76.
Anexo 7	Equipos utilizados en la elaboración del MRC	77.
Anexo 8	Métodos utilizados por los laboratorios en la Ronda de Intercomparación	78.
Anexo 9	Determinación del contenido de masa inicial de agua en la matriz Alfonsino.	79.
Anexo 10	Analizador de tamaños de partículas	82.
◦	Propiedades de la luz difractada	82.
Anexo 11	Curvas de radioactividad inducida para AAN	83.
Anexo 12	MRCs utilizados en la caracterización del material - Determinación de la exactitud del método AAN	83.
Anexo 13	Espectrofotómetro de Absorción Atómica	84.
◦	Funcionamiento EAA	84.
Anexo 14	Evaluación estadística. Determinación de homogeneidad	85.
Anexo 15	Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor	87.
Anexo 16	Teorema del límite central	88.
Anexo 17	Evaluaciones estadísticas. Ronda de intercomparación para determinación de fracción de masa de mercurio	89.
Anexo 18	Transformación de masas a base seca	91.

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema resumido del ciclo del mercurio	8.
Figura 2	Familia de los Materiales de Referencia	12.
Figura 3	Componentes de un analizador de Difracción de Láser	25.
Figura 4	Gráfico de distribución de tamaño de partículas de la muestra	43.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Resultados primera medición de humedad inicial de la matriz Alfonsino	41.
Tabla 2	Resultados medición de humedad inicial de la matriz Alfonsino luego de 24 horas de análisis	41.
Tabla 3	Distribución tamaño de partículas candidato a MRC-Alfonsino	42.
Tabla 4	Resultados obtenidos en la preparación del candidato a MRC-Alfonsino	51.

---

## INDICE DE ABREVIATURAS

AAN = Análisis por activación neutrónica

CALs = Materiales usados para la calibración o calibrantes

CCHEN = Comisión Chilena de Energía Nuclear

CV = Coeficiente de Variación

$CV_{bb} \%$  = Coeficiente de variación debido a heterogeneidad entre unidades

$CV_{rAAN} \%$  = Coeficiente de variación de repetibilidad del método AAN

$CV_L \%$  = Coeficiente de variación de interlaboratorios

$CV_u \%$  = Coeficiente de variación de la incertidumbre combinada

DER% = Desviación estándar relativa porcentual

EAA = Espectrofotometría de absorción atómica

g = Gramo

h = Número mínimo apropiado de unidades a tomar para la caracterización

He-Ne= Helio-Neón

Hg = Mercurio

k = Factor de cobertura

kg = Kilogramo

m = Masa pequeña de muestra utilizada en el análisis

M = Mínimo tamaño representativo de muestra para el análisis

Me-Hg<sup>+</sup> ó CH<sub>3</sub>-Hg<sup>+</sup>= Metilmercurio

mg = Miligramo

mm= Milímetro

MR = Material de referencia

MRC = Material de referencia certificado

mss = Masa sólido seco

$MS_{entre}$  = Cuadrado de las medias (mean square) entre unidades

---

$MS_{dentro}$  = Cuadrado de las medias (mean square) dentro de las unidades

$N$  = Unidades del lote

$n_o$  = Número de replicados

NAC = N-acetyl-L-cisteína

Nm = Nanometro

$p$  = Nivel de confianza

Pa = Pascal

ppm = Partes por millón

ppb = Partes por billón

QCM = Materiales de Control de Calidad

$s$  = Desviación estándar muestral

SI = Sistema Internacional de Unidades

$s_r$  = Desviación estándar de repetibilidad

$s_R$  = Desviación estándar de reproducibilidad ínter laboratorios

$S_{HM}$  = Variabilidad debida a heterogeneidad presentada por una masa  $M$

$S_{Hm}$  = Variabilidad debida a heterogeneidad presentada por una masa  $m$

$s_{bb}^2$  = Varianza debida a la heterogeneidad entre unidades

$s_{bb}$  = Desviación estándar debido a heterogeneidad entre unidades

$s_{wb}$  = Desviación estándar debido a heterogeneidad dentro de unidades

$s_L^2$  = Varianza entre laboratorios

ton = Toneladas

$u_i$  = Incertidumbre estándar individual

$u_i^2$  = Varianza estimada

$u_c(y)$  = Incertidumbre estándar combinada de la medición

$u_{MRC}$  = Incertidumbre del valor de la propiedad del MRC

$u^2_{char}$  = Incertidumbre debida a la caracterización

$u^2_{bb}$  = Incertidumbre debida a la variación entre las unidades

$u^2_{Its}$  y  $u^2_{sts}$  = Incertidumbre debida a la estabilidad a largo y corto plazo

---

U = Incertidumbre expandida

y = Resultado de la medición

Y = Valor del mensurando

### **Símbolos**

B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> = Borohidruro de sodio

μm = Micrómetro

μg = Microgramo

γ = Rayo gamma

λ = Longitud de onda

$\bar{x}$  = Media aritmética

σ = Desviación estándar poblacional normal

$s_x$  = Desviación estándar de la media muestral

## RESUMEN

En las últimas décadas, la preocupación mundial por garantizar la inocuidad de los alimentos ha determinado que diversas organizaciones nacionales e internacionales hayan legislado con respecto a contaminantes prohibidos, tales como los elementos traza.

La manera en que el mercurio (Hg) es desechado al ambiente y su capacidad de biotransformación hacia metilmercurio (Me-Hg<sup>+</sup>) han determinado que, en la actualidad, se tenga un especial cuidado en la forma que este elemento y su compuesto orgánico pueda afectar la vida humana mediante sus interrelaciones en la cadena alimentaria.

El presente estudio tiene por objetivo la preparación de un Material de Referencia Certificado (MRC) para el elemento mercurio en una matriz de pez Alfonsino extraído de las costas chilenas. El propósito de este MRC es que cumpla con los más altos estándares de calidad y trazabilidad, para así ponerlo a disposición de los laboratorios nacionales de análisis que certifican productos pesqueros.

Para la caracterización del material de referencia certificado se realiza una ronda de intercomparación con diferentes laboratorios nacionales e internacionales, donde, mediante técnicas de activación neutrónica (AAN) y espectrofotometría de absorción atómica (EAA), se determina que la fracción de masa de mercurio presente es de 0,63 mg/kg (base seca). La incertidumbre asociada a este valor es de 0,02 mg/kg en un nivel de confianza del 95%. La fracción de masa transformada a base húmeda es de  $0,15 \pm 0,01$  (mg/kg).

Por otro lado, se obtuvo un contenido de humedad inicial de 77,03 g de agua por 100 g de matriz y un tamaño medio de partícula del material de 88,08  $\mu\text{m}$  determinado mediante la técnica de difracción con rayo láser.

Del estudio realizado se puede concluir que el MRC-Alfonsino es altamente homogéneo, ya que si se utiliza, para la determinación de mercurio, una masa de material cercana a 1 g, la contribución de la heterogeneidad de las muestras sobre la incertidumbre total es de 1%.

---

## ABSTRACT

In the last decades, the world-wide preoccupation to guarantee the innocuousness of foods has determined that diverse national and international organizations have legislated in relation to prohibited pollutants, such as trace elements.

The way in which mercury (Hg) is rejected to the environment and its capacity of transformation into methyl mercury (Me-Hg<sup>+</sup>) have determined that, at the present time, a special care is taken according to the way this element and its organic compound can affect human life throughout its relationships within the food chain.

The objective of the present study is to prepare a Certified Reference Material (CRM) for mercury in an Alfonsin fish matrix, extracted of the Chilean coasts. The purpose of this CRM is to fulfill the highest quality standards, thus to put it to disposition of the national laboratories of analyses that certify fishing products.

For the characterization of the certified reference material a round of intercomparison with different national and international laboratories was made, which determined that, by techniques of neutron activation (NAA) and atomic absorption spectrophotometry of (AAS), the mercury mass fraction is 0,63 mg/kg (dry base). The uncertainty associated to this value is 0,02 mg/kg in a level of confidence of 95%. The mass fraction transformed to humid base is  $0,15 \pm 0,01$  (mg/kg).

Also, an initial humidity content of 77,03 g of water for every 100 g of matrix was obtained, and a 88,08  $\mu\text{m}$  medium sized particle was detected by diffraction with laser beams technique.

Of the recent analysis, it is possible to conclude that the CRM-Alfonsin is highly homogenous, determining that, when using masses of material for mercury determination near to 1 g, the contribution of the variance due to the heterogeneity of the samples over the total uncertainty is 1%.

---

## CAPÍTULO 1

# **ANTECEDENTES GENERALES**

## 1.1.

## INTRODUCCION

La industria de alimentos, segunda fuerza exportadora nacional, enfrenta grandes desafíos ya que está apostando a entrar al grupo de los diez mayores exportadores mundiales de alimentos al 2010. Hoy, este grupo está formado por países desarrollados, como Estados Unidos, Francia, Holanda, entre otros, por lo que Chile debe hacer un gran esfuerzo para entrar a competir en las grandes ligas (APA, 2006). Para lograr los grandes beneficios económicos y sociales que esta oportunidad traería, nuestra industria nacional debe satisfacer con éxito las exigencias técnicas establecidas por los mercados internacionales, principalmente en los requisitos de certificación sanitaria.

Debido a las crecientes exigencias impuestas a los laboratorios de análisis químicos que certifican la calidad, hoy en día, éstos requieren de la calibración de sus instrumentos, validación de sus métodos de análisis y determinación de la incertidumbre de sus datos. Una de las formas más utilizada para cumplir los requisitos anteriores es el uso de Materiales de Referencia (MRs) y Materiales de Referencia Certificados (MRCs), los que han tenido una creciente importancia en las actividades nacionales e internacionales de normalización y acreditación (Pastor, 2004).

La demanda por nuevos MRCs de la más alta calidad metrológica está aumentando como consecuencia de la mayor sensibilidad de los equipos y de la necesidad de contar con datos más exactos y confiables en las disciplinas científicas (ISO, 2000b).

A pesar de la disponibilidad de Materiales de Referencia internacionales, se hace difícil conseguir aquellos con una matriz similar a la de las muestras que se analizan rutinariamente en cada país en cuanto al tipo y composición de la matriz (es importante que la concentración del analito de interés en el MR(C) sea del mismo orden de magnitud que en las muestras reales) (CCHEN, 2000).

Actualmente, existen organizaciones competentes que producen y ponen a disposición de la comunidad científica mundial diversos MRs y MRCs. Entre estas organizaciones se encuentran el NIST (National Institute of Standards and Technology) de EE.UU., el IRMM (Institute of Reference Materials and Measurements) de la Unión Europea, la IAEA (International Atomic Energy Agency) y el LGC (Laboratory of the Government Chemist) del Reino Unido (Pastor, 2004).

La preparación de un MR(C) es un proceso delicado donde se deben extremar las precauciones para que el producto cumpla los requisitos que lo harán técnicamente útil y que su uso sea apropiado para los Laboratorios de Ensayo (CCHEN, 2000).

El gran avance tecnológico del país y su aumento en las exportaciones pesqueras, las que tuvieron un incremento de un 10,6 por ciento entre enero y agosto de este año respecto de igual período de 2005, alcanzando 1.039,02 millones de dólares (AQUA, 2006), hacen altamente necesario que el país cuente con MR(C)s apropiados para asegurar la trazabilidad de sus resultados analíticos.

El ambiente marino es el recipiente de una amplia variedad de productos químicos desechados por industrias y otras fuentes. Los posibles impactos ambientales ocasionados por estos químicos están provocando una considerable preocupación, ya que pueden grandes causar cambios ecológicos dependiendo de la concentración en que se encuentren, el período de tiempo por el cual estén presentes y la sensibilidad de los organismos que viven en el ambiente. Esto ha hecho necesario investigar y cuantificar en diferentes muestras una serie de elementos considerados dañinos para la salud (Sepúlveda, 2000).

El mercurio, elemento constitutivo de la tierra, se genera de manera natural en el medio ambiente. Este metal se encuentra actualmente en diversos medios y alimentos (especialmente el pescado) en todas partes del mundo a niveles que afectan adversamente a los seres humanos y la vida silvestre (PNUMA, 2002).

El pescado es una parte importante de una dieta saludable, contiene proteínas de alta calidad y nutrientes esenciales que son bajos en grasas saturadas y contienen ácidos grasos omega-3. Una dieta bien equilibrada que incluya pescados y mariscos variados puede contribuir a la salud cardíaca y al crecimiento y desarrollo adecuado de los niños. Por lo tanto, en particular, mujeres y niños deben incluir pescados o mariscos en sus dietas debido a sus grandes beneficios nutricionales (EPA, 2006).

En Chile, el Alfonsino (*Beryx splendens* Lowe, 1834), o Besugo americano, se captura principalmente en el archipiélago Juan Fernández. Posee una carne firme, de color blanco y excelente calidad, que lo hace un producto altamente cotizado en el mercado internacional, siendo Japón y China los principales destinos de exportación (Subpesca, 2006). Este pez, al tener un crecimiento lento, alcanza una concentración apta de contaminantes ambientales que permiten proponerlo como matriz de un MRC nacional para cuantificar este elemento traza.

Debido a esto, la presente investigación tiene por finalidad preparar un MRC nacional utilizando una matriz de músculo de pez Alfonsino, en el cual se ha cuantificado el elemento Mercurio (Hg) total debido a su importancia toxicológica.

Este estudio se desarrolló en la Sección de Metrología Química del Departamento de Aplicaciones Nucleares de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), organismo de administración autónoma del Estado que contribuye a que los Laboratorios de Ensayos Nacionales cuenten con MR(C)s en matrices naturales para análisis químico. Dentro de sus actividades, la CCHEN colabora con la IAEA en la “caracterización físico química de los candidatos a “Material de Referencia Certificado” a través de rondas de ínter comparación donde participan laboratorios de diversos países del mundo. La sección de Metrología Química otorga soporte técnico a los laboratorios nacionales para que éstos eleven sus estándares de calidad analítica y así puedan cumplir con las exigencias internacionales. El laboratorio de Activación Neutrónica perteneciente a esta sección está acreditado por el Instituto Nacional de Normalización (INN) como Laboratorio de Ensayo según la NCh-ISO 17025.Of2001 en el área química para matrices geológicas y tejidos biológicos (CCHEN, 2002).

### **1.1.1. Hipótesis**

La hipótesis del estudio es que la matriz de músculo de pez Alfonsino es apta para realizar un MRC hidrobiológico nacional que cumpla los requisitos internacionales de calidad metrológica.

### **1.1.2. Objetivo Principal**

Es preparar un Material de Referencia Certificado de interés nacional que cumpla con los más altos estándares de calidad y trazabilidad, para así ponerlo a disposición de los Laboratorios Nacionales de Análisis que certifican productos pesqueros. El Material de Referencia se certificará para Mercurio en una matriz de pez Alfonsino extraído de las costas chilenas.

Los objetivos específicos son:

- a) Realizar la cuantificación de los diferentes parámetros del MRC:
  - Determinar el contenido de agua inicial de la matriz
  - Determinar el contenido de humedad residual del material elaborado.
  - Determinar la distribución del tamaño de partícula mediante la técnica de Difracción de Rayos Láser. Se determinará que el tamaño del material sólido sea lo suficientemente pequeño para verificar que éste sea homogéneo.
  - Determinar la homogeneidad del material. Se realizan 2 tipos de ensayos de homogeneidad, uno entre unidades y otro dentro de cada unidad, los que se evalúan estadísticamente.
  - Determinar la fracción de masa del analito Mercurio y su incertidumbre asociada utilizando las técnicas de Análisis por Activación Neutrónica (AAN) y Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA).
- b) Verificar la estabilidad del Material de Referencia Certificado para ver si las propiedades del analito de interés se mantienen en el tiempo.
- c) Determinar la cantidad de MRC a usar en cada análisis de rutina.

## 1.2.

### MARCO TEÓRICO

La Metrología es la rama de la ciencia que se ocupa de las mediciones, de los sistemas de unidades y de los instrumentos usados para efectuarlas e interpretarlas. Ésta comprende los aspectos teóricos y prácticos de las mediciones y sus incertidumbres en los campos de aplicación científico, industrial y legal (Anexo 1) (RNM, 2005). La aplicación de la metrología es una obligación en toda empresa que se preocupe de la calidad.

La Química Analítica es una ciencia metrológica, ya que su objetivo fundamental es ofrecer resultados basados en medidas experimentales. Estos resultados han adquirido cada vez más importancia, ya que sirven de base para numerosas transacciones económicas a nivel mundial. Al fijar los precios en el mercado, se hace necesaria una estandarización para que los resultados esperados se refieran a una misma unidad o criterio aceptado por toda la comunidad (Sepúlveda, 2000). Desde el punto de vista social, se requiere adoptar patrones de referencia que sirvan de base a todos los usuarios para conseguir medidas exactas y asegurar el ajuste a las leyes nacionales y criterios internacionales con respecto al control de la contaminación y la calidad de productos agroalimentarios e industriales (Bievre, 2005a).

Los resultados de los análisis químicos permiten desde el aseguramiento de la calidad de los alimentos, hasta el control de calidad de materias primas en procesos de manufactura en todo el país, pasando por el control de la contaminación ambiental y los aspectos relacionados con la salud (Pastor, 2004).

El gran número de mediciones químicas que se realizan a diario requieren de resultados exactos, precisos, confiables y trazables según el Sistema Internacional de Unidades (SI) (Anexo 2) (CCHEN, 2000).

Para poder comprender mejor los conceptos de Metrología es necesario conocer algunas definiciones especificadas en el Anexo 3.

### **1.2.1. Alfonsino o Besugo americano (*Beryx splendens* Lowe, 1834)**

El Alfonsino es una especie que habita entre los 25 y 1.300 metros de profundidad y su distribución está asociada a aguas marinas templadas y tropicales de todos los océanos. Presenta una alimentación preferentemente zooplanctófaga, tiene un peso aproximado de 500 gramos y un color de piel rojo característico. Es una especie de baja tasa de renovabilidad, de madurez sexual cercana a los 9 años y de crecimiento lento, llegando a vivir hasta 19 años (Rico, 2001).

A nivel nacional, esta especie habita de preferencia sobre los montes submarinos cercanos al Arch. Juan Fernández y sus desembarques se realizan principalmente en los puertos de Talcahuano, Valparaíso, Puerto Montt y Aisén (Subpesca, 2006).

Puede decirse con propiedad que en Chile la pesquería de Alfonsino comenzó en 1998, año en el cual se desembarcaron oficialmente 144 toneladas por la flota industrial. Posteriormente, los desembarques experimentaron un fuerte aumento, incrementándose en casi un 1.300% entre 1999 y 2003 (Subpesca, 2006). Considerando las características de la especie y para que la biomasa no disminuya a niveles indeseados, se fijó una cuota global anual de captura de 2.700 toneladas de Alfonsino para el año 2006 (Pescachile, 2005; Sernapesca, 2006).

En el país, el Alfonsino se procesa principalmente al estado congelado y también al fresco refrigerado. El mayor destino de la producción nacional es la exportación, siendo Japón y China los principales destinos.

En Chile, el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), perteneciente al Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, es el organismo que ejecuta la política pesquera nacional y fiscaliza el cumplimiento de las leyes y normativas que regulan esta actividad. El manual "Métodos de análisis de residuos de productos farmacéuticos y contaminantes para productos pesqueros de exportación" incluye la lista de sustancias monitoreadas y los requisitos y procedimientos establecidos por el Programa de Control de Fármacos para productos pesqueros de exportación.

El Anexo 4 hace referencia a las especificaciones del Alfonsino.

### 1.2.2. Mercurio

En su forma pura se le conoce como mercurio “elemental” ( $\text{Hg}^0$ ), es un metal plateado, que a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido, el cual, si no está encapsulado, se evapora parcialmente formando vapores de mercurio, los que son nocivos para los seres humanos y el medio ambiente (PNUMA, 2002; Drasch, 1994).

El mercurio, una vez liberado a partir de los depósitos de combustibles fósiles y minerales de la corteza terrestre y emitido a la biosfera, puede tener una gran movilidad y circular en la atmósfera, cambiando de estado y especie. Ciertos microorganismos y procesos naturales pueden hacer que el  $\text{Hg}^0$  en el medio ambiente pase de una forma a otra, lo que abre una significativa vía para la sedimentación de mercurio elemental emitido (Figura 1).

Cuando el mercurio se combina con carbono se forman los compuestos “orgánicos” de mercurio. Existe una gran cantidad de estos compuestos, siendo el metilmercurio ( $\text{Me-Hg}^+$  ó  $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ ) el más conocido de todos. El  $\text{Me-Hg}^+$  se forma principalmente en el medio ambiente por procesos bióticos, por ejemplo, por efecto de ciertas bacterias y, en menor medida, por procesos químicos (PNUMA, 2002).

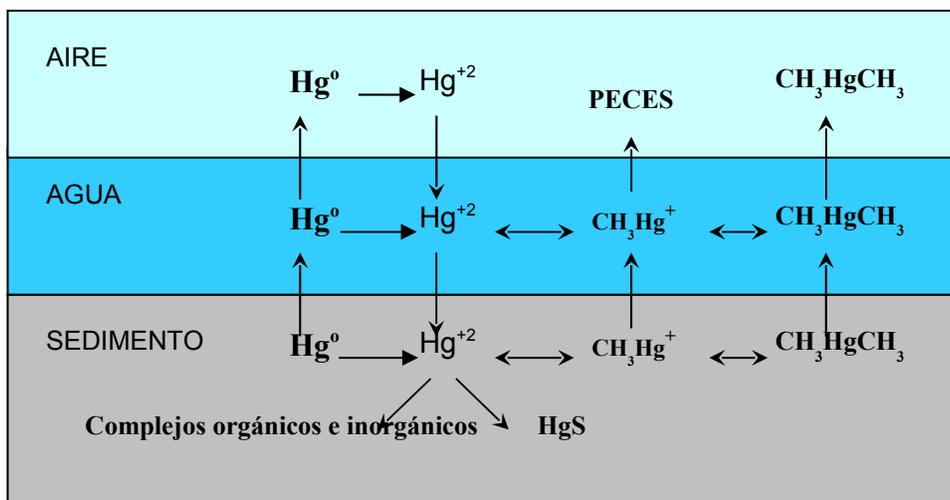


Figura 1: esquema resumido del ciclo del mercurio (Ramos, 2000).

Estudios han demostrado que la presencia de sulfuro libre tiene una influencia directa en la solubilidad del  $\text{Me-Hg}^+$  en el agua a través de la formación de complejos  $\text{Me-HgSH}$ . Otro factor importante es que la reducción en el pH del agua aumenta la acumulación de  $\text{Me-Hg}^+$  en peces (Bravo, 2003; Drasch, 1994).

La especiación (distribución del mercurio entre sus diversas especies) es un factor determinante para la distancia que recorre el mercurio emitido en el aire desde su fuente de emisión (EPA, 2006). Partículas y compuestos de mercurio iónico caen, sobre todo, en el suelo y el agua cercanos a las fuentes, mientras que el vapor de mercurio elemental se transporta a escala hemisférica o mundial. La toxicidad del mercurio también depende de su forma química y, por lo tanto, los síntomas y signos varían según la especie de que se trate (Bravo, 2003; Ramos, 2000).

El  $\text{Me-Hg}^+$  es un neurotóxico muy bien documentado que puede causar lisis de las neuronas (apoptosis) afectando perjudicialmente al cerebro en formación (retraso mental, ceguera, parálisis cerebral, sordera, entre otros.) (EPA, 2006; Drasch, 1994). Además, debido a sus características lipofílicas, este compuesto es capaz de interactuar con las membranas celulares y ser absorbido por difusión pasiva (su tasa de absorción es cercana al 90-95%), traspasando con facilidad la barrera placentaria y hematoencefálica, por eso, es muy preocupante la exposición durante el embarazo (PNUMA, 2002; EPA, 2006).

Cerca del 90% de todo el  $\text{Me-Hg}^+$  presente en el cuerpo humano se encuentra en los glóbulos rojos, el 10% restante se distribuye en el cerebro, hígado, riñón, entre otros órganos. Las intoxicaciones con estos compuestos tienen un largo período de latencia, incluso para dosis letales no se presentan síntomas antes de 4 a 7 semanas.

El Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*, 1993) considera que los compuestos de metilmercurio pueden ser carcinógenos para los seres humanos. Además, se han detectado otros efectos perjudiciales a exposiciones mayores, como efectos en el sistema nervioso adulto y en la genotoxicidad (el  $\text{Me-Hg}^+$  actúa sobre el ADN y ARN, ya que liga los grupos sulfhidrilos) (PNUMA, 2002; Bravo, 2003).

En cuanto a las consideraciones relativas a la alimentación, las concentraciones determinadas de mercurio en diversas especies de peces van de 0,05 a 1,4 miligramos de mercurio por kilogramo de tejido de pez (mg/kg), dependiendo de factores como la especie, edad y tamaño del pez (EPA, 2006). El mercurio se biomagnifica en la cadena alimentaria acuática, por lo tanto, los peces que se encuentran en un nivel trófico superior suelen tener niveles mayores (casi el 100% del mercurio que se bioacumula en peces es metilmercurio) (PNUMA, 2002).

Según el Reglamento de la Unión Europea (2001) y las directrices CAC/GL 7 de la Comisión del Codex Alimentarius (1991), el contenido máximo de mercurio en productos de pesca es de 0,5 mg/kg peso fresco, excepto para peces depredadores como atún, bonito, raya, anguila, tiburón, etc., donde la concentración máxima es de 1,0 mg/kg peso fresco.

Para poner en perspectiva el nivel de exposición actual al metilmercurio, la dosis máxima de consumo, según la Environmental Protection Agency (EPA), es de 0,1 µg de mercurio por kilo al día. Esta dosis ha sido considerada para proteger a niños y mujeres embarazadas, quienes son los más afectados por los efectos perjudiciales de este elemento, por lo tanto, estos niveles de referencia son seguros para todas las personas (NRDC, 2005). Según el “Environmental Health Criteria” de la World Health Organization (WHO, 1991), la dosis considerada como letal es de 100 mg de metilmercurio (Drasch, 1994).

Es importante recalcar que en el cuerpo humano la vida media del Me-Hg<sup>+</sup> es entre 44 a 60 días y las formas de eliminación son a través de las heces, orina y leche materna. Sin embargo, en casos severos de intoxicación los daños pueden ser irreversibles debido a la destrucción neuronal (Ramos, 2000; Bravo, 2003; Drasch, 1994).

A nivel nacional, el Artículo 160 del Reglamento Sanitario de los Alimentos establece una dosis máxima de mercurio permitida en peces de 0,5 a 1,5 mg/kg de producto final.

El Anexo 5 corresponde a información sobre el Mercurio.

### 1.2.3.

### MATERIALES DE REFERENCIA

Según la guía ISO 35 (2006), un Material de Referencia (MR) se define como "un material o sustancia suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más de sus propiedades específicas, que se ha establecido como adecuado para el uso intencionado en un proceso de medición".

Las propiedades pueden ser cualitativas o cuantitativas. Los usos pueden incluir calibración de un equipo, validación de un procedimiento de medición, asignación de valores a otros materiales y control de la calidad. Un MR puede ser usado para un sólo propósito en una medición determinada.

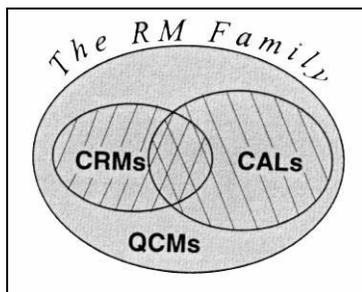
Un Material de Referencia Certificado (MRC), según ISO 35 (2006), es "un MR caracterizado por un procedimiento metrológico validado para una o más de sus propiedades específicas, acompañado por un certificado que entrega el valor de la propiedad, su incertidumbre asociada y una declaración de la trazabilidad metrológica".

Los procedimientos metrológicos válidos para la producción y certificación de un MR están, entre otros, en la guía ISO 34 (2000) e ISO 35 (2006) (Anexo 3.I).

A partir de estas nuevas definiciones de MR y MRC, se puede concluir que el término de Material de Referencia abarca a una familia (Figura 2) compuesta por:

- a) Materiales de Control de Calidad (QCM): son todos los materiales que cumplen con las características adecuadas de homogeneidad y estabilidad requeridas para el control de la calidad de una medición determinada, pero que no han sido suficientemente caracterizados para ser utilizados en la calibración de métodos o para proveer trazabilidad metrológica (Bievre, 2006b; Emons, 2006).
- b) Materiales usados para la calibración o calibrantes (CALs): estos materiales generalmente se conocen como "estándares analíticos" ó "estándares de calibración". Los materiales CALs que cuentan con sus valores certificados están dentro de la clasificación de MRC (Bievre, 2006b; Emons, 2006).

- c) MRC: los cuales están por sobre los QCM. Todos los MRCs cumplen los requisitos para ser usados como QCM, pero no todos se pueden utilizar como CALs.



- a) QCMs: Materiales de Control de Calidad  
b) CALs: calibrantes  
c) MRCs: Material de Referencia Certificado

Figura 2: familia de los Materiales de Referencia.

El productor de un material de referencia es un organismo técnicamente competente, responsable de asignar los valores de propiedades a los MR que produce de acuerdo a las guías ISO 31 e ISO 35 (ISO, 1992; INN, 1998a).

El productor debe establecer, implementar y mantener un sistema de calidad apropiado para el alcance de sus actividades que asegure la calidad en todos los aspectos que involucra la producción de un MR, incluyendo:

- disposiciones para asegurar una apropiada selección del candidato a MR (matriz, tamaño de partícula, concentración, etc.)
- procedimientos de preparación
- evaluación y cuantificación del grado deseado de homogeneidad del material
- evaluación de la estabilidad del MR
- procedimientos para la caracterización
- trazabilidad a estándares nacionales e internacionales
- asignación de valores de propiedad, incluyendo la elaboración del certificado cuando sea necesario
- provisión de instalaciones convenientes de producción
- disposiciones para la identificación, etiquetado y envasado del MR, procedimientos de transporte y servicio al cliente (ILAC, 2000).

Es importante señalar que, tanto para los MRCs que se utilizan una vez cada uno o dos meses, como para los MRs que se intentan usar día a día en diversos análisis, debe haber una correcta manipulación y conservación de los mismos, especialmente una vez que han sido abiertos.

Las precauciones para su conservación dependerán del tipo de material, pero, como norma general, el material se debe mantener en su botella original, no debe ser expuesto a fuentes intensas de radiación, debe conservarse a bajas temperaturas, en un ambiente seco y, si es necesario, en atmósferas inertes y protegidos de la luz. Otra norma es nunca devolver al recipiente original el excedente de material tomado para un análisis y respetar la fecha de vencimiento del mismo (Valcárcel, 1992).

La caracterización de un MR(C) es el proceso por el cual se determinan los valores de las propiedades que van a ser cuantificadas.

La guía ISO 35 (2006) reconoce dos procedimientos principales para la caracterización de MR(C)s:

- medición por un método único definitivo
- medición por múltiples métodos y/o múltiples laboratorios competentes.

Al emplear diversos métodos se minimizan los errores inherentes de un método en particular y, de forma análoga, al participar varios laboratorios se eliminan los errores asociados a uno sólo, debido a esto, la combinación de ambos procedimientos sería lo más adecuado.

Los procedimientos de medición utilizados en la caracterización se deben realizar de manera trazable a referencias establecidas.



### 1.2.3.a. Requisitos de un Material de Referencia

#### a) Requisitos Básicos:

- *Trazabilidad*: el elemento principal de la metrología es el concepto de trazabilidad, el cual desde hace algún tiempo se ha venido aplicando a los resultados obtenidos en la medición de magnitudes (CENAM, 2002).

La trazabilidad es la propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón que puede relacionarse con una incertidumbre establecida, generalmente a patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones (ISO, 1992).

La trazabilidad del valor convencional de propiedad del MRC se debe establecer por una combinación de los siguientes procesos:

- uso de estándares trazables para calibrar equipos de medición
  - uso de patrones primarios (Anexo 3.s.)
  - uso de sustancias puras (MR)
  - uso de una matriz apropiada en un MRC
  - uso de un método de referencia validado
  - comparación de resultados de un mismo método en diversos laboratorios (Eurachem, 1995; ISO, 2006).
- *Exactitud*: grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado (valor verdadero convencional del mensurando) (Eurachem, 1995).
  - *Homogeneidad*: condición de una estructura o de una composición de ser uniforme respecto a una o más de sus propiedades especificadas. La sección 2.4. contiene especificaciones sobre la homogeneidad del MR(C).

*Incertidumbre*: la incertidumbre de una medida es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían

razonablemente ser atribuidos al mensurando (Anexo 3.b.). El parámetro puede ser por ejemplo, la desviación estándar (INN, 1998b; Castelazo, 2002).

El resultado de una medición es sólo una aproximación del mensurando y éste está completo sólo cuando se acompaña de una declaración de su incertidumbre (NIST, 1994). La sección 2.4.1. contiene especificaciones sobre la incertidumbre del MR(C).

- *Estabilidad*: capacidad de un MR(C), cuando está almacenado en condiciones específicas, de mantener un valor de propiedad dado dentro de los límites determinados durante un período de tiempo especificado (ISO, 1992; ISO-VIM, 1993). La sección 2.6. contiene especificaciones sobre la estabilidad del MR(C).

**b) Requisitos Adicionales:**

- *Matriz*: es la base, orgánica o inorgánica, en la que se prepara el MR(C). Para comprobar la exactitud de los procedimientos analíticos la matriz debe ser lo más parecida posible al material sobre el que se aplica el procedimiento de medida (ISO, 2000a).
- *Precisión*: grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en las condiciones prescritas. No se relaciona con el valor verdadero del mensurando, sino con la dispersión: a menor precisión, mayor desviación estándar (ISO, 1992; Eurachem, 1995). La precisión es uno de los parámetros que se deben determinar al momento de validar un método de ensayo (Anexo 3.I).

La medición de precisión incluye la desviación estándar de repetibilidad,  $s_r$  (indica la variación de los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando efectuadas bajo las mismas condiciones de medición) y la desviación estándar de reproducibilidad ínter laboratorios,  $s_R$  (muestra la variabilidad de los resultados de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de medición

modificadas). La medición de repetibilidad entrega menor imprecisión al método, mientras que la medición de reproducibilidad le otorga mayor variación.

Cuanto mayor sea la precisión del procedimiento de medida, mayor será el grado de homogeneidad que debe tener el MRC. En muchos casos, el grado de homogeneidad vendrá definido para un tamaño de muestra determinado (ISO, 2000a).

## CAPÍTULO 2

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE REFERENCIA**

Los propósitos de cualquier MR(C), tanto en muestras naturales como fortificadas (Anexo 3.r.) son: que el analito de interés esté presente en aproximadamente la misma concentración que en las muestras de análisis; que la matriz sea lo más parecida posible a la muestra y que por sobre todo las muestras sean lo más homogéneas posibles (Kramer, 2001).

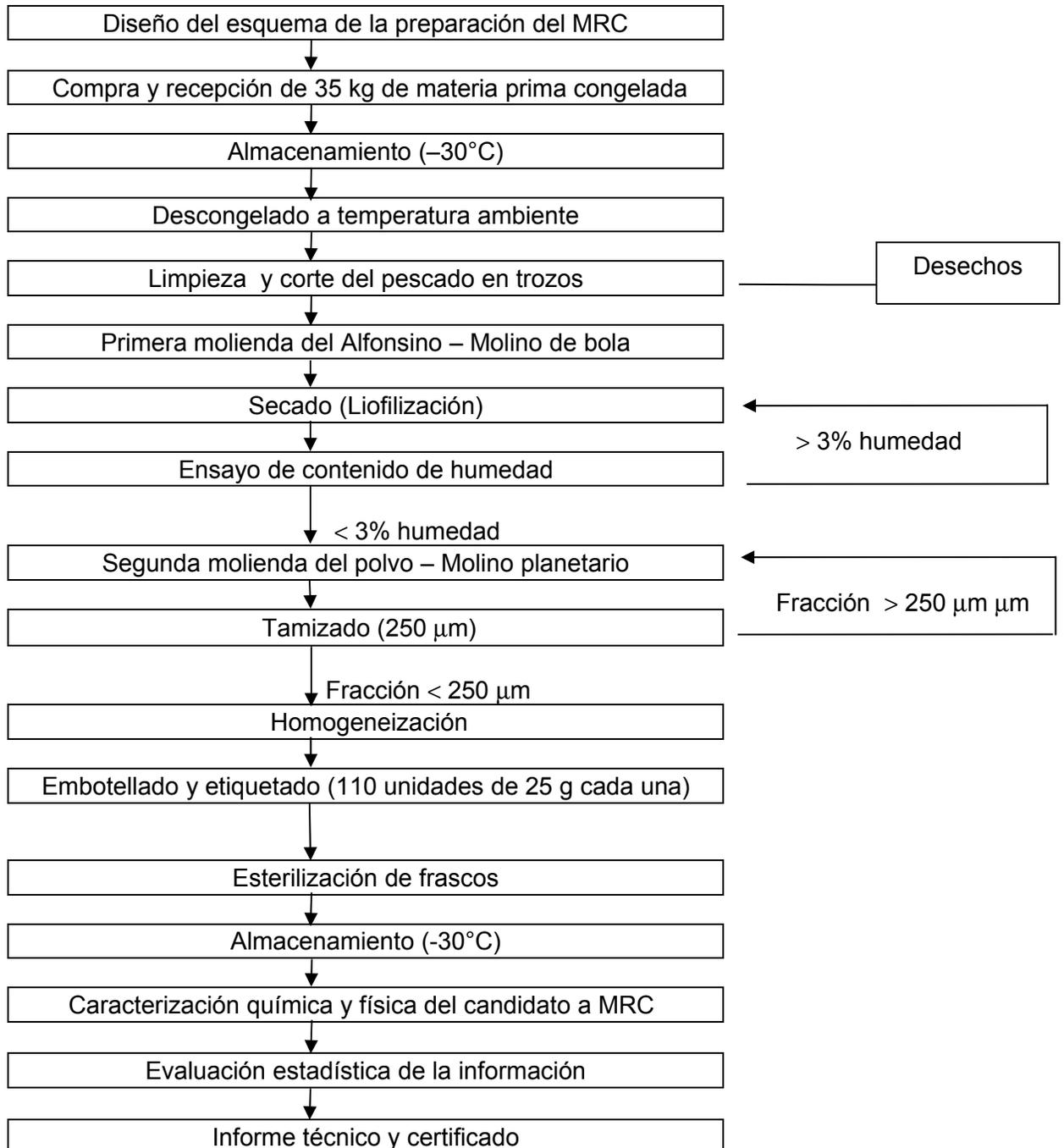
Antes de empezar la producción de un MR(C), el productor debe seleccionar el método apropiado de preparación y muestreo, teniendo en cuenta las características del material base, concentración del analito y número de unidades a producir. Se deben identificar todos los riesgos, tales como, factores que afectan la degradación del analito, falta de homogeneidad en las muestras y contaminación del material.

Mientras menor sea la concentración del analito en las muestras, mayor será el riesgo de contaminación. Los componentes de contaminación pueden venir de: las herramientas o equipos utilizados; por difusión desde estanques de almacenamiento o botellas de muestreo; del ambiente del laboratorio; de las fibras de ropa; cabello; maquillaje; talco de guantes; etc. (Kramer, 2001; ISO, 2000b).

Cada método que se utilice en la producción de un MRC debe estar debidamente validado, documentado y debe incluir los protocolos que definan todas las evaluaciones de los diferentes análisis, calibraciones y mediciones relacionados a la actividad. Cada equipo que se utilice debe estar calibrado, verificado y sus resultados documentados para asegurar que su uso es correcto (ISO, 2000b).

Todos los instrumentos que estén en contacto con la matriz se deben lavar cuidadosamente. Para la cuantificación específica de elementos traza, el primer paso es sumergir los utensilios en ácido nítrico o clorhídrico de grado analítico diluido (20%) durante 24 horas, luego se sumergen en estos mismos ácidos puros durante una a dos horas, para finalmente lavarlos con agua destilada y dejarlos secar en un ambiente libre de contaminación (Kramer, 2001).

**a) Diagrama de bloques: MRC, Mercurio en Alfonsino**



**b) Descripción del diagrama de bloques:**

- *Compra y recepción de la materia prima:* se recibieron 35 kg de Alfonsino HG (sin cabeza ni agallas) eviscerado y congelado, de calibre 100 – 300 gramos, extraídos de las costas entre Coquimbo y Santiago por la empresa nacional FríoSur. Adquirir la materia prima de un sólo productor tiene ventajas en la homogeneidad del producto, tales como conocer la población de donde proviene, área de recolección, tipo de alimentación, etc. (Kramer, 2001).

La cantidad de matriz necesaria para la preparación del MRC dependerá de:

- el número de unidades requerido, incluyendo las unidades necesarias para los ensayos.
  - cantidad de MRC (polvo o líquido) necesario por unidad.
  - pérdidas durante el procesamiento: remoción de partes que no se deben usar, pérdida de agua luego del secado, pérdida durante la molienda, durante el tamizado y durante el embotellado.
- *Almacenamiento de la materia prima:* se debió mantener a una temperatura aproximada de -25 a -30°C y a una humedad entre 30 y 35%. Para lograr estas temperaturas se almacenó la matriz en un freezer durante toda la elaboración del material. Durante cada etapa de la preparación se monitoreó y registró, mediante termocuplas, la temperatura del freezer en las que se encontraba la matriz.
  - *Limpieza de la matriz:* se eliminaron escamas, espinas y cola de la matriz descongelada desde la noche anterior a temperatura ambiente. La selección de los instrumentos que están en contacto directo con la base del MRC es de gran importancia ya que la mayoría de los equipos y herramientas están hechas de acero inoxidable, un excelente material para analitos orgánicos, pero que se debe evitar al analizar elementos traza, ya que la muestra se puede contaminar con partículas del acero (Fe, Ni, Cr, etc.).

Para este tipo de muestras se debe usar teflón, polietileno, polipropileno o incluso vidrio. En cuanto a los instrumentos usados para cortar, se deben reemplazar por cuchillos de titanio (Kramer, 2001).

- *Molienda del Alfonsino*: se realizó la reducción de tamaño de la matriz utilizando un equipo molidor y luego un molino de bola. La finalidad de la molienda fue lograr una mayor eficiencia durante el secado. Durante esta etapa también se procedió a reemplazar los cuchillos del molidor por cuchillos de titanio para evitar contaminación.
- *Secado*: la eliminación del agua de la matriz se puede realizar mediante tres técnicas: secado en estufa, secado al ambiente o secado criogénico (liofilización). En materiales biológicos se prefiere el secado mediante liofilización para evitar la pérdida de los analitos sensibles a altas temperaturas y no desintegrar la muestra. El liofilizador tiene como función separar el agua de una sustancia congelándola y sublimándola después, con presión reducida o vacío, así el hielo formado se vaporiza sin fundir.

La matriz molida se distribuyó en una totalidad 104 placas de Petri, las que se colocaron dentro de la cámara del liofilizador. Cada cápsula se pesó vacía, con el material húmedo y luego con el material seco para determinar la masa inicial de agua en la matriz.

El proceso, comenzó con una congelación brusca a temperaturas muy bajas (-80°C aprox.), condición esencial para que el agua forme microcristales de hielo en vez de cristales grandes que rompen las membranas intercelulares y alteran tejidos.

Luego, se procedió a una desecación primaria, mediante la cual, practicando vacío en la cámara (aprox. 10 Pa) el hielo se sublima. La operación se facilita por un ligero calentamiento del producto. Al finalizar este primer secado, la humedad del producto debiera estar entre 5 – 10%. Una vez eliminada la mayor parte de agua, el producto se calentó hasta temperatura ambiente (aprox. 1 Pa). Esta desecación secundaria ultima el proceso de deshidratación. Este segundo secado redujo la humedad hasta un valor óptimo para la estabilidad del material (0,5 – 4%). Para extraer de la cámara de

liofilización el vapor que resulta de la sublimación se utilizó un condensador (CCHEN, 1998; Helman, 2001).

- *Segunda molienda*: se realizó mediante un molino planetario de alta velocidad con contenedores y bolas de teflón. ). La molienda se produce debido a que las bolas van chocando entre sí y con las paredes del molino, lo que va reduciendo el tamaño de la muestra. Dentro de cada recipiente se introdujeron ocho bolas de 25 mm de diámetro, previamente lavadas, junto a 60 g de muestra congelada con nitrógeno líquido (-196°C
- *Tamizado del polvo*: la heterogeneidad de los polvos secos, en cuanto a diferencias de concentración del analito, es casi siempre una consecuencia de la segregación de las partículas debido a su variada composición, densidad y tamaño. Cuando las partículas están vibrando dentro del set de tamices (shaker), las propiedades que causan dicha segregación, en orden de importancia, son: diferencia de tamaño, diferencia de densidad y diferencia de forma.
- *Homogeneización*: la experiencia muestra que la homogeneización no sólo mezcla partículas, sino también las cambia de forma, ya que se pulen unas a otras durante el proceso. Mientras más redondeada la forma que se crea, mejor es el polvo (menos cohesivo). El proceso de interacción partícula-partícula es lento, por lo tanto, la homogeneización es un proceso largo.

El total del polvo obtenido de candidato Alfonsino se homogeneizó durante 160 horas aproximadamente.

- *Embotellado y etiquetado de los frascos*: El texto de las etiquetas de los frascos de los MRCs debe indicar el nombre del productor, un nombre o número de identificación del material e información sobre la composición y propósito del MR (ISO, 2000b).

Una vez obtenida la totalidad el polvo homogeneizado (2780 g) se procedió a embotellar manualmente el material. Se envasó en botellas de vidrio de 125 ml de volumen, obteniendo un total de 110 frascos con 25 g de candidato a MRC cada uno.

- *Esterilización del material*: las muestras se esterilizaron mediante irradiación con rayos gamma durante 19 horas con una dosis de 25 kGrey, para así reducir el número de microorganismos y aumentar la estabilidad del producto.

- *Almacenamiento*: dependiendo de las expectativas de estabilidad del MR, éste se debe almacenar en condiciones apropiadas de temperatura, humedad, luz, movimiento, etc.

En el caso del candidato a MRC-Alfonsino, se almacenó a temperaturas de congelación (-30°C) para no afectar de ninguna manera la matriz.

- *Caracterización química y física del candidato a MRC*: los ensayos de humedad, tamaño de partícula, estabilidad y homogeneidad se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Aplicaciones Nucleares de la CCHEN. La determinación de homogeneidad se realizó mediante la técnica Análisis por Activación Neutrónica (AAN). Las muestras se llevaron a cápsulas de vidrios, las que se sellaron mediante calor. Luego, éstas ingresaron al reactor donde fueron activadas.

La cuantificación de la fracción de masa del elemento Mercurio se realizó mediante una ronda de íter comparación con 7 laboratorios (Anexo 8) utilizando las técnicas de AAN y EAA.

- *Elaboración del certificado y documento técnico del MRC*: el certificado de un MRC debe contener, a lo menos, la siguiente información: identificación del productor; identificación del MRC (nombre, código, número de batch); descripción del material (origen, historia y propósito); instrucciones sobre el correcto uso del material; grado de homogeneidad; valores certificados y sus incertidumbres; trazabilidad; fecha de certificación; estabilidad; y nombre del analista (ILAC, 2000).

El Anexo 6 hace referencia a la preparación del material Alfonsino.

## 2.2.

### DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Para asegurar la estabilidad de los polvos secos es necesario que el contenido de humedad sea lo suficientemente bajo para prevenir la actividad bacteriana, especialmente en muestras orgánicas. Muchos materiales biológicos secos son higroscópicos y, dependiendo de la humedad relativa del aire, puede producirse un aumento en la masa del polvo luego de algunas horas de exposición al ambiente (Kramer, 2001).

La humedad total de una muestra incluye el agua libre (superficial y capilar), que es la disponible para el desarrollo microbiológico, y el agua cristalizable (ligada). No hay método analítico que distinga estas formas de agua. El secado nunca puede llevar a la deformación de la matriz (eliminación de la totalidad del agua ligada), lo que podría ocurrir en secados muy agresivos. Dependiendo del material, esta agua de “seguridad” debe estar entre 0,5 – 4% (Kramer, 2001).

Existen varios métodos para determinar la humedad de una muestra: secado directo en estufa, secado por el método de Karl Fisher y secado en estufa al vacío.

El método más utilizado es el secado directo en estufa. La Internacional Dairy Federation (IDF), en el Standard 26A, establece para este método una masa de muestra de 1 a 3 g que debe tratarse a  $102 \pm 2$  °C hasta obtener masa constante. Para las matrices orgánicas, la NCh. 2670 (2001) establece que es preferible trabajar a temperaturas más bajas, entre 60 – 80 °C, para evitar que la muestra se descomponga y asegurar que la pérdida de masa se debe completamente al contenido de humedad. El tiempo necesario para llegar a peso constante depende de la matriz que se está utilizando, pero generalmente va de 12 horas hasta varios días. Se considera masa constante a la diferencia de masa  $< 1\%$ , es decir, si se toma una muestra de 1 g, se realiza la medición hasta que la diferencia de pesos de medidas sucesivas sea menor a 1 mg (Kramer, 2001).

### 2.3.

### DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Existen tres métodos para determinar el tamaño de partícula: observación microscópica, difracción de rayo láser y análisis del tamiz (Kramer, 2001).

La técnica mayormente utilizada, Difracción de Rayos Láser, permite analizar muestras en polvo, emulsiones y/o suspensiones, húmedas o secas. La muestra se dispersa en una solución soporte (metanol), en la cual sea insoluble, no forme aglomerados, no altere sus propiedades físico-químicas y cuyo índice de refracción sea diferente al del sólido problema. El instrumento consta de una fuente de energía radiante (láser de He-Ne), una celda para contener la muestra, detectores de radiación que convierten la energía radiante en una señal utilizable (energía eléctrica) y un sistema de procesamiento de la señal que visualiza ésta en una escala de medida (CCHEN, 2005).

El rayo láser choca con un juego de filtros, dispersando rayos paralelos, o haz analizador (localizado por un conjunto de detectores), en un rango de ángulos de difracción inversamente proporcional al tamaño de partícula. Cuando el haz analizador incide sobre el portamuestras que contiene las partículas de interés, éstas difractan la luz, la que, junto a la luz no dispersada, incide sobre un sistema de lentes receptoras (Figura 3). Estas lentes se caracterizan en que no importa en qué parte del haz del láser se encuentre la partícula, ya que el patrón de difracción es siempre centrado alrededor del eje óptico. La óptica del sistema es lo suficientemente rápida como para que el movimiento de las partículas de la muestra no interfiera con la medida. La señal procedente de cada detector se amplifica, digitaliza pasando a un sistema electrónico de medida y transfiere a un ordenador con el que se procede a su análisis mediante el correspondiente software (TDR, 2005; Becerra, 2006).

La determinación del tamaño de la partícula se mide por integración de la dispersión debida a todas las partículas interpuestas en el camino del láser. La cantidad de partículas necesaria varía entre 100 y 1000, dependiendo de su tamaño (TDR, 2005).

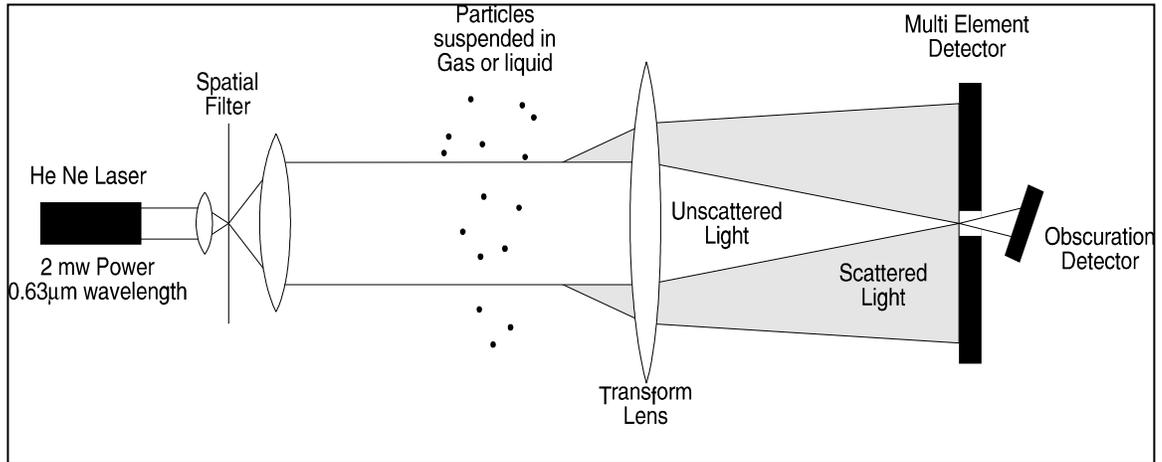


Figura 3: componentes de un analizador de Difracción de Láser (Becerra, 2006).

Como resultado de este análisis se obtiene el diámetro de partícula medio y la distribución de tamaño de partícula. Una vez analizada la muestra se estima, para cada rango de diámetros, el porcentaje en volumen de partículas cuyo tamaño cae en dicho rango. Los diámetros de partícula obtenidos del análisis se calculan a partir de esferas equivalentes y de la optimización de la distribución en intervalos de clases para la mejor resolución del detector y la configuración óptica. El diámetro de partícula resultante es la media geométrica de los valores del intervalo. A través de la medida de la luz dispersada se obtiene la distribución de tamaño de partículas, en formato tabular o gráfico, que permite la evaluación de las características del producto. Con el fin de disminuir el error durante la medición, ésta se repite durante cinco segundos y, de un promedio, resulta la distribución de tamaño de partícula (TDR, 2005; Becerra, 2006).

## 2.4.

## CUANTIFICACIÓN DEL ANALITO

### 2.4.1. Análisis por Activación Neutrónica (AAN)

Una reacción nuclear podría definirse como los cambios o transformaciones inducidos en un núcleo por la interacción de partículas nucleares de todo tipo, conducentes a la transformación de nuevos núclidos o radioisótopos, generalmente inestables y, por ende, radioactivos, y a la emisión de partículas nucleares iguales o distintas de las iniciadoras de la reacción (CCHEN, 2006).

Abreviadamente, las reacciones nucleares se representan de la siguiente forma:



, donde

A= núcleo blanco

a= partícula nuclear incidente

B= núcleo producido en la reacción

b= partícula nuclear emitida

En el análisis por activación, las reacciones nucleares de interés pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo al tipo de partículas bombardeantes, que, en orden de facilidad de obtención de partículas, son: reacciones con neutrones, reacciones con partículas cargadas y reacciones con fotones (CCHEN, 2006).

La reacción más común de activación neutrónica es la captura de neutrones o reacción  $(n,\gamma)$ , en la cual un neutrón de baja energía es capturado por el núcleo mediante la emisión de un rayo gamma inmediato a la captura (CCHEN, 2006).

El análisis por activación neutrónica es una técnica nuclear de análisis químico que permite la determinación cuantitativa de un gran número de elementos y presenta, para cierto tipo de elementos y matrices, considerables ventajas frente a otros métodos analíticos, tales como:

- es una técnica instrumental no destructiva;
- entrega en forma simultánea información multielemental;
- para muchos elementos se obtienen límites de detección que van desde las partes por millón hasta las partes por billón;
- por ser un método basado en procesos que tienen lugar en el núcleo atómico el estado físico y químico de los elementos no influye en el resultado final;
- y la ausencia de pre-tratamiento de la muestra hace de este análisis una técnica adecuada para el análisis de trazas (CCHEN, 2006).

La técnica de AAN se realiza principalmente en tres etapas: la primera consiste en irradiar con neutrones la muestra en el núcleo del reactor. El neutrón, al interactuar con el núcleo, forma un núcleo compuesto que inmediatamente se desintegra, produciéndose la reacción nuclear correspondiente con características únicas y que no se duplican en ningún caso conocido. La segunda etapa consiste en la obtención de los espectros gamma de las muestras radiactivas; en la última etapa, los espectros gamma son procesados utilizando programas computacionales, los que transforman la información digital almacenada en el computador en valores de concentración. Este proceso se basa en que las energías de los fotopicos espectrales identifican los elementos presentes en la muestra y en que las áreas de los fotopicos son proporcionales a las concentraciones de los elementos (CCHEN, 2006).

Cada núclido radioactivo es perfectamente identificable por el tipo y energía de las radiaciones emitidas y por su período de semi desintegración. Los tiempos de irradiación del material blanco son variables dependiendo de la probabilidad de captura neutrónica del elemento estable, del flujo de neutrones y de la vida media del producto (Anexo 11) (CCHEN, 2006).

#### 2.4.2. Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA)

En los últimos años se han desarrollado modernos equipos, con innovadora instrumentación, que utilizan principios de absorción atómica. Estos equipos representan grandes ventajas para la investigación, ya que permiten analizar pequeñas cantidades de muestra y detectar pequeñas diferencias entre ellas (Sepúlveda, 2000).

Los principios de la EAA se basan en que todos los átomos pueden absorber luz, que la longitud de onda ( $\lambda$ ) a la cual la luz es absorbida es específica para un elemento químico particular y que la cantidad de luz absorbida, teóricamente, es proporcional a la concentración de átomos absorbentes. La EAA usa la absorción de la luz para medir la concentración de la fase gaseosa de átomos: los átomos absorben luz (ultravioleta-visible) y hacen transiciones a niveles de energía más altos. Los átomos e iones de la muestra sufren una vaporización a altas temperaturas mediante un horno de grafito o una llama. El horno de grafito acepta soluciones, mezclas o muestras sólidas, en cambio, la llama sólo puede ionizar soluciones analíticas (Sepúlveda, 2000).

El espectrofotómetro está formado por: una fuente primaria para generar luz a la  $\lambda$  característica del analito; un dispositivo de atomización (llama u horno) para crear una población de átomos del analito libre; un sistema óptico para dirigir la luz de la fuente primaria a través de la nube de átomos y dentro del monocromador; un monocromador para separar la luz a la  $\lambda$  del analito del haz completo de luz; y un detector eléctrico sensible a la luz adecuado para medir y traducir la respuesta en una señal analítica útil.

La fuente primaria es, generalmente, una lámpara de cátodo hueco, donde el cátodo contiene el elemento a determinar. El haz de luz es una radiación eléctrica o mecánica. Cuando se aplica un voltaje suficiente a través de los electrodos, el gas de relleno (argón) dentro de la lámpara es ionizado. Estos iones se aceleran hacia el cátodo y, al golpearlo, provocan que el material del cátodo forme un vapor atómico en el que los átomos están presentes en un estado electrónico excitado. Una vez que vuelven al estado basal, los átomos que se producen en el atomizador absorben radiación de resonancia de la fuente primaria, reduciendo la intensidad del haz incidente.

El monocromador aísla la línea de resonancia y permite que esta radiación llegue al detector produciendo una señal eléctrica, cuya magnitud depende de la intensidad de la luz. El dispositivo electrónico mide la atenuación de la luz provocada por la muestra y convierte estas lecturas a la absorbancia de la muestra o directamente a su concentración (Sepúlveda, 2000). La EAA es un método comparativo, ya que en el análisis cuantitativo se comparan las respuestas de los materiales de calibración con las muestras problema y se usan estas respuestas para establecer valores de concentración para el elemento de interés.

Existen diversos tipos de EAA dependiendo del analito que se requiere cuantificar: con horno de grafito, con generador de hidruro, con amalgamación en red de oro y con generador de vapor frío.

El Anexo 13 se refiere al equipo de EAA.

a) Horno de grafito (Atomización Electrotérmica):

Los atomizadores de llama y horno proporcionan el mismo producto final: un suministro de átomos de analito libres para ser expuestos a la luz de  $\lambda$  característica, pero existen diferencias en sus mecanismos. En la tecnología de llama, la cantidad de muestra aspirada que se convierte en la población de átomos libres para ser medidos en el camino óptico es baja. Con los hornos de grafito, la eficiencia de conversión es alta, ya que se usa toda la muestra disponible para producir la población de átomos dentro del camino óptico, por lo que las medidas de absorbancia son más altas. Las considerables mejoras en cuanto a la sensibilidad de los hornos de grafito se deben a la introducción de la muestra completa en el atomizador, evitando la dilución de la población atómica de los gases de la llama (Sepúlveda, 2000).

Para los análisis de rutina, una pequeña cantidad de muestra se introduce en el atomizador. El tubo de grafito se calienta de acuerdo a un programa electrotérmico determinado (temperatura vs. tiempo), generando una población de átomos de analito libres para medir la absorción atómica.

Generalmente, los programas electrotérmicos constan de tres etapas: secado (queda el analito junto a los sólidos de la matriz); pirólisis (la matriz se descompone térmicamente a temperaturas cercanas a 1500°C); y atomización (disociación de las especies moleculares del analito a temperaturas de 3000°C, generando átomos libres dentro de una zona coincidente con el camino óptico del espectrofotómetro).

b) Método con amalgamación en red de oro:

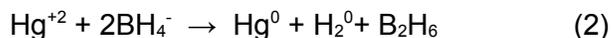
Esta técnica robusta (Anexo 3.p.) se basa en la extracción de especies organomercuríicas mediante el uso de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Para el procedimiento se utilizan alícuotas de muestra a las que se agregan  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{CuBr}_2$  y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El uso de  $\text{CuBr}_2$  permite disminuir la formación artificial de  $\text{MeHg}^+$  durante el procesamiento. Este reactivo combina la acción complejante del bromuro con la capacidad desplazante del Cu (II) sobre el mercurio (Fernández, 2005).

Se deben separar las fases orgánicas y acuosas. Una vez que la primera fase ha sido recuperada cuantitativamente, se lleva a contenedores de cuarzo junto a N-acetyl-L-cisteína, NAC. Se realiza la evaporación del solvente orgánico, para luego agregar  $\text{HNO}_3$ . Finalmente, las muestras se analizan utilizando el equipo DMA-80. Este analizador directo se basa en la atomización electrotérmica del mercurio. Luego de la descomposición, los productos obtenidos son acarreados mediante una corriente de oxígeno hasta el amalgamador en red de oro, donde queda atrapado el mercurio. Al calentar el sistema, los vapores de mercurio pasan a las celdas de absorción del espectrofotómetro, donde se mide la concentración del elemento a la longitud de onda correspondiente, que en el caso del mercurio es de 253,65 nm (Fernández, 2005).

c) Generador de vapor frío:

Esta técnica es exclusiva para la cuantificación de mercurio, elemento que a temperatura ambiente se encuentra en estado gaseoso, por lo cual el método no requiere del calentamiento del analito para su vaporización.



Se debe realizar una digestión previa de la muestra, ya que el EAA con generador de vapor frío sólo acepta muestras líquidas. La muestra líquida se ataca con una mezcla ácida oxidante, lo que convierte todas las formas presentes de mercurio en Hg (II). Luego, se realiza la reducción de este compuesto a vapor de mercurio en estado elemental mediante un reductor (borohidruro de sodio) en el generador de hidruro. Éste es un accesorio de alta sensibilidad que permite determinar elementos metálicos que sean capaces de formar hidruros volátiles (PRT, 2005).

El vapor atómico resultante (frío) se arrastra mediante una corriente de gas (argón) hacia una celda de cuarzo ubicada en el paso óptico de un EAA sin llama (INN, 2001a).

Antes de introducir la muestra problema en el EAA, se debe realizar la curva de calibración (en mg/L de mercurio) del equipo mediante el uso de muestras blanco y estándares de referencia a las concentraciones de mercurio esperadas en la muestra. A partir de las lecturas de absorbancia neta (muestra menos blanco) obtenidas para las muestras, se interpolan en la curva de calibración y luego se calcula la concentración de mercurio en mg/kg de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Mercurio (mg/kg)} = (P \times V) / M \quad (3)$$

P= mg/L de mercurio obtenidos de la curva

M= masa de la muestra, kg

V= volumen de aforo, L (INN, 2001a).

## 2.5.

### DETERMINACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD

En un candidato a MRC es fundamental realizar una prueba de homogeneidad para detectar una posible heterogeneidad del elemento de interés y poder estimar su magnitud. Este ensayo se realiza luego que el material se ha llevado a su envase final como unidades utilizables (frascos, botellas, etc.).

En teoría, se dice que un material es perfectamente homogéneo con respecto a una característica dada si es que no hay diferencias entre los valores de la característica en una parte (ítem) o en otra. Sin embargo, en la práctica, un material se considera homogéneo con respecto a una característica dada si la diferencia entre los valores de ésta, en una parte (ítem) u otra, es menor que cuando se compara con los demás componentes de incertidumbre (ISO, 2006).

Un material puede ser suficientemente homogéneo respecto a las características de interés como para ser considerado MRC, aunque no lo sea respecto a otras características, siempre y cuando, esta falta de homogeneidad no suponga una influencia significativa en la incertidumbre asociada a métodos normalmente utilizados para determinar las características de interés (ISO, 2006).

La heterogeneidad puede manifestarse a lo menos de dos formas:

- a) Distintas submuestras de una unidad del candidato a MRC pueden diferir en la propiedad de interés (heterogeneidad dentro de la unidad);
- b) Distintas unidades del candidato a MRC pueden presentar diferencias en la propiedad de interés (heterogeneidad entre las unidades).

### 2.5.1. Número de unidades y submuestras a medir

Para medir homogeneidad entre las unidades de un material que fue preparado como un único lote se recomienda al productor escoger aleatoriamente las muestras y así dar a cada unidad una oportunidad igual de selección. Según la Comisión Europea (1994), para obtener el número mínimo apropiado de unidades a tomar  $h$  de un total  $N$  de unidades del lote se debe utilizar la siguiente fórmula: “el entero más próximo a tres veces la raíz cúbica del número total de unidades individuales”.

$$h = 3 * \sqrt[3]{N} \quad (4)$$

Para probar la homogeneidad dentro de cada unidad se debe analizar 2 o más submuestras por unidad seleccionada y realizar los cálculos de comparación utilizando un análisis de varianza (ANOVA) (Sepúlveda, 2000).

### 2.5.2. Incertidumbre

El proceso de estimación de la incertidumbre de una medición incluye los siguientes pasos:

- Especificación del mensurando
- Identificación de las fuentes de incertidumbre
- Cuantificación de los componentes de incertidumbre
- Cálculo de la incertidumbre combinada

Generalmente, las fuentes de incertidumbre se pueden agrupar en dos categorías según el método que se utiliza para estimar su valor numérico:

- Evaluación Tipo A: los que se pueden evaluar por métodos estadísticos.
- Evaluación Tipo B: los que se pueden evaluar por otros métodos (NIST, 1994).

La evaluación tipo A de la incertidumbre estándar se puede basar en cualquier método estadístico válido para el tratamiento de datos, por ejemplo, ANOVA.

Según el Comité Internacional de Pesos y Medidas (CIMP), se debe representar cada contribuyente de la incertidumbre como una estimación de la desviación estándar, llamada incertidumbre estándar individual ( $u_i$ ), la cual es la raíz positiva de la raíz cuadrada de la varianza estimada ( $u_i^2$ ) (NIST, 1994).

La incertidumbre estándar combinada ( $u_c$ ) se obtiene por la combinación las incertidumbres estándares individuales ( $u_i$ ). A este método de combinación se le conoce como “Ley de propagación de la incertidumbre”, la cual es la raíz cuadrada positiva de la suma de los cuadrados de las incertidumbres individuales (Eurachem, 1995).

Generalmente, la distribución de probabilidad de una medición, caracterizada por el resultado de la medición ( $y$ ) y por su incertidumbre estándar combinada ( $u_c(y)$ ), se asume como aproximadamente *normal* (esto es, cuando se cumple el Teorema del límite central, Anexo 15).

Cuando ( $u_c(y)$ ) tiene una incertidumbre despreciable y la distribución se asume *normal*, se define un intervalo  $[y - u_c(y); y + u_c(y)]$ , en el cual el valor del mensurando ( $Y$ ) se cree se encuentra con un nivel de confianza ( $p$ ) de aproximadamente el 68%. Esto significa que se cree, con un nivel de confianza aproximado del 68%, que  $[y - u_c(y) \leq Y \leq y + u_c(y)]$ , lo que se escribe como  $Y = y \pm u_c(y)$  (NIST, 1994).

En muchas mediciones es necesaria una incertidumbre que defina un intervalo sobre el resultado de la medición, en donde el valor del mensurando ( $Y$ ) se crea está presente en un nivel de confianza mayor. La incertidumbre que cumple este requerimiento se conoce como incertidumbre expandida ( $U$ ) y se obtiene al multiplicar ( $u_c(y)$ ) por un factor de cobertura ( $k$ ). Esto significa que se cree, con un nivel de confianza mayor al 68%, que  $[y - U \leq Y \leq y + U]$ , lo que se escribe como  $Y = y \pm U$  (NIST, 1994).

En términos simples, el nivel de confianza puede definirse como el porcentaje de veces cuando, en promedio, el *valor verdadero* de una propiedad se encuentra dentro de los límites de incertidumbre establecidos (INN, 2003).

En general, el valor del factor de cobertura se elige según el nivel de confianza deseado. Comúnmente, el valor de ( $k$ ) está entre 2 y 3.

Cuando se aplica la distribución *normal*, y  $k=2$ , se cumple que  $U = 2(u_c(y))$ , lo que define un intervalo de confianza de aproximadamente el 95%. Cuando  $k=3$ , se define un intervalo de confianza de aproximadamente 99% (NIST, 1994).

Cuando el número de grados de libertad (efectivos) es muy pequeño (menor a 6) se prefiere utilizar una distribución *t de Student* en vez de una *normal* para asignar el valor de ( $k$ ) (ISO, 2006; Eurachem, 1995).

La incertidumbre de un MRC se puede deber a la incertidumbre asociada a la caracterización, homogeneidad y estabilidad a largo y corto plazo. Asumiendo la independencia de las variables, la incertidumbre asociada del valor de una propiedad de un MRC se puede expresar como:

$$uMRC = \sqrt{u^2_{char} + u^2_{bb} + u^2_{lts} + u^2_{sts}} \quad (5)$$

, donde

$uMRC$  = incertidumbre del valor de la propiedad del MRC

$u^2_{char}$  = incertidumbre debida a la caracterización

$u^2_{bb}$  = incertidumbre debida a la variación entre las unidades

$u^2_{lts}$  y  $u^2_{sts}$  = incertidumbre debida a la estabilidad a largo y corto plazo (ISO, 2006).

### 2.5.3. Masa de prueba mínima de muestra representativa

El concepto práctico de homogeneidad involucra la determinación de la característica de interés y de un parámetro de la dispersión de los resultados. En muchos casos, la precisión alcanzable por un método de medida es afectada por el tamaño de la porción de prueba tomada. Por lo tanto, el grado de homogeneidad se define para un tamaño de prueba específico (Sepúlveda, 2000).

El certificado de un material de referencia debiera proporcionar una masa mínima de muestra adecuada para determinar el analito de interés basada en un riguroso estudio de homogeneidad.

La fórmula descrita a continuación permite determinar la masa mínima de muestra en el cual el material determinado se considera homogéneo:

$$\frac{S_{Hm} (\%)}{S_{HM} (\%)} = \sqrt{\frac{M}{m}} \quad (6)$$

, donde

$m$  = masa pequeña de muestra utilizada en el análisis

$M$  = masa grande de muestra, mínimo tamaño representativo de muestra

$S_{HM}$  = variabilidad debida a heterogeneidad presentada por una masa  $M$

$S_{Hm}$  = variabilidad debida a heterogeneidad presentada por una masa  $m$

Esta fórmula se utiliza para determinar la variabilidad debida a la heterogeneidad de los diferentes métodos utilizados en la caracterización atribuida a una misma masa de muestra (masa representativa).

## 2.6.

### DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD

Los estudios de estabilidad tienen por objetivo determinar el grado de inestabilidad del candidato a MRC después de su preparación. Estos estudios se realizan luego que se ha demostrado la suficiente homogeneidad del material.

Hay dos tipos de estudios:

- *Estudio de estabilidad a largo plazo*: determina la inestabilidad del valor de propiedad del material bajo condiciones específicas de almacenamiento (temperatura, humedad, luz, campos magnéticos, etc.).
- *Estudio de estabilidad a corto plazo*: determina la inestabilidad del valor de propiedad bajo las condiciones de transporte. Generalmente, este estudio se realiza a diferentes temperaturas (–50 a 70°C aprox.) para ver el efecto de ésta sobre las propiedades del material. El estudio de estabilidad a corto plazo siempre debe tener una duración mayor al tiempo aproximado de transporte.

Los ensayos de estabilidad requieren de un gran número de muestras (al menos 10 a 12 unidades por temperatura) y que el método del estudio trabaje bajo condiciones de repetibilidad (ISO, 2006).

Para determinar la incertidumbre declarada en el certificado de un MRC se debe realizar una correcta estimación de los efectos debidos a la estabilidad de corto y largo plazo, así como una correcta evaluación de la heterogeneidad del batch (ISO, 2006).

Existen dos maneras de realizar los estudios de estabilidad:

- *Estudio de estabilidad clásico*: muestras individuales elaboradas durante el mismo período se van evaluando a medida que pasa el tiempo. En este caso, el trabajo se realiza bajo condiciones de reproducibilidad, lo que conlleva a altos valores de incertidumbre (debido a que se incluye la inestabilidad del sistema de medición).

- *Estudio de estabilidad isocrónico*: se realiza para permitir que todas las mediciones se desarrollen bajo condiciones de repetibilidad (por ejemplo, una medición con una calibración).

La palabra “isocrono” enfatiza que todas las mediciones se realizan en un mismo momento (al final del estudio). Generalmente, este tipo de estudio presenta incertidumbres menores al método clásico (ISO, 2006).

Ambos métodos sirven para determinar estabilidades a corto y largo plazo. Para el estudio a corto plazo se evalúan las propiedades del material bajo las mínimas condiciones requeridas durante el transporte (ISO, 2006).

Los estudios de estabilidad incluyen los siguientes componentes de estabilidad:

- repetibilidad de la medición
- inestabilidad del material
- inestabilidad del sistema de medición (en el estudio clásico)
- aspectos de reproducibilidad (en el estudio clásico se debe considerar las calibraciones)
- homogeneidad entre unidades (en la certificación de batchs) (ISO, 2006).

De los factores antes mencionados, se puede deducir que, siempre que sea posible, se debe preferir el estudio isocrónico, ya que éste sólo se ve afectado por tres factores:

- repetibilidad de la medición
- inestabilidad del material
- homogeneidad entre unidades (ISO, 2006).

## CAPÍTULO 3

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. CONTENIDO DE AGUA TOTAL EN LA MATRIZ ALFONSINO PARA REALIZAR EL CÁLCULO A BASE HÚMEDA**

Durante la etapa de liofilización (30 horas con una temperatura máxima de 30 °C) se procesaron las 104 placas de Petri que contenían 200 g aproximadamente de matriz Alfonsino molido cada una. Las placas se pesaron antes y después del secado y por diferencia de pesos se determinó la masa de agua inicial.

Del Anexo 9 se obtienen los datos de masas de Alfonsino durante la preparación del material.

A partir del promedio de las masas de agua individuales de cada placa utilizada se determinó una masa promedio igual a  $77,03 \pm 1,33 \%$ .

Contenido de agua inicial: 77,03 g de agua /100 g de Alfonsino fresco
---

La determinación de la masa inicial de agua es un factor de gran importancia, ya que la reglamentación, en cuanto a los límites máximos de concentración de metales pesados, se encuentra en base al peso fresco de la matriz, no del polvo seco del material.

Por lo tanto, este valor permite transformar valores, como la fracción de masa del analito mercurio encontrado en el candidato a MRC-Alfonsino, a base húmeda así poder compararlo con la reglamentación establecida.

### 3.2. CONTENIDO DE HUMEDAD RESIDUAL DEL MRC

Se realizan 2 mediciones para determinar el contenido de humedad:

Tabla 1: primer resultado obtenido luego de 15 horas de secado dentro en estufa a 75 °C. Luego, se midió cada hora hasta peso constante.

Medición	Peso Muestra (g)
1	1,0039 g
2	0,9869 g
3	0,9807 g
4	0,9805 g
5	0,9805 g
Masa sólido seco (mss) = 0,9805 g	
Masa de agua (mH <sub>2</sub> O) = 1,0039 – 0,9805 = 0,0234 g	

$$\text{Humedad (base seca)} = \frac{\text{mH}_2\text{O}}{\text{mss}} \quad (7)$$

$$\text{Reemplazando, } X = \frac{0,0234}{0,9805} = 0,0239 = 2,39 \text{ g de agua/100 g de material}$$

Tabla 2: resultado obtenido por una única medición luego de 24 horas de secado en estufa a 75 °C.

Medición	Peso Muestra
1	0,9967 g
2	0,9728 g
Masa sólido seco (mss): 0,9728 g	
Masa de agua (mH <sub>2</sub> O): 0,9967 – 0,9728 = 0,0239 g	

$$X = \frac{0,0239}{0,9728} = 0,0246 = 2,46 \text{ g de agua/100 g de material}$$

Humedad promedio residual del material de 2,43 g de agua /100 g de material.

Esta humedad comprueba que el candidato a MRC-Alfonsino contiene una cantidad final de agua adecuada, ya que, ésta debiera estar entre 0,5 y 4% para asegurar que no se haya producido un secado excesivo que deforme la matriz, ni tampoco que haya quedado presente una humedad mayor que altere la estabilidad del material en las condiciones óptimas señaladas.

### 3.3. TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL MRC

Para la muestra de Alfonsino se usó la técnica de difracción de rayo láser, utilizando un analizador de distribución y tamaño de partículas, Mastersizer X (Anexo 10), con una solución de suspensión de metanol, una longitud de onda del rayo láser de  $0,63 \mu\text{m}$  y un lente de tamaño  $300 \text{ mm}$  que lee partículas de  $1,2$  a  $600 \mu\text{m}$ . La muestra previa al análisis se sometió a una homogenización con ultrasonido por 20 segundos.

El resultado entregado por el equipo es una distribución de volumen relativo expresado en términos del volumen de esferas equivalentes.

Tabla 3: distribución tamaño de partículas candidato a MRC-Alfonsino.

$d(0,5) = 69,75 \mu\text{m}$
$d(0,1) = 16,04 \mu\text{m}$
$d(0,9) = 186,97 \mu\text{m}$
$D [4,3] = 88,088 \mu\text{m}$
Mode = $75,05 \mu\text{m}$
Obscuration = $17,49\%$

De la tabla 3 se observa que:

- El tamaño medio de partículas (D) de la muestra es  $88,08 \mu\text{m}$
- El 50% de la distribución (d) corresponde a tamaños bajo  $69,75 \mu\text{m}$
- El 10% de la distribución (d) corresponde a tamaños bajo  $16,04 \mu\text{m}$
- El 90% de la distribución (d) corresponde a tamaños bajo  $186,97 \mu\text{m}$
- La obscuración se relaciona con la cantidad de muestra necesaria para el análisis. El valor óptimo está entre 10 y 24%. Para la determinación de la distribución de partículas del candidato a MRC-Alfonsino, la masa utilizada fue de  $1,0 \text{ g}$  obteniendo una obscuración de  $17,49\%$ , lo que afirma que la cantidad de masa utilizada fue correcta.

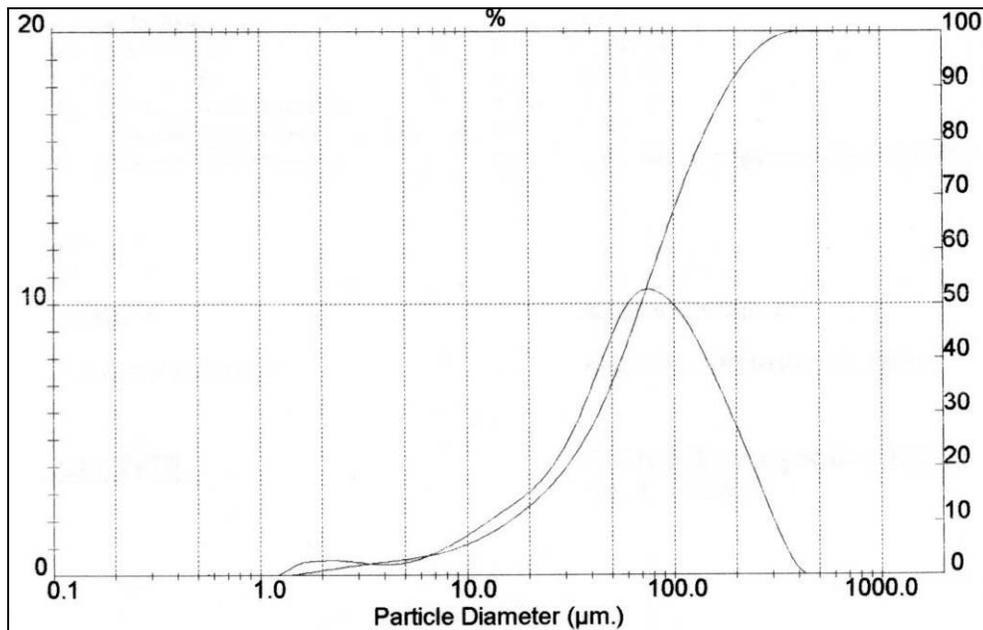


Figura 4: gráfico de distribución de tamaño de partículas de la muestra: V (%) y V (%) Acumulativo v/s Diámetro de las partículas en  $\mu\text{m}$ .

Del gráfico 4 se observa que la mayoría de las partículas tienen entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que representa aproximadamente un 40 % del volumen total de la distribución. También se observa que el mayor diámetro que se registra es de 400  $\mu\text{m}$  aproximadamente y corresponde a un 0,58 % del volumen total.

El diámetro medio de partículas observado para el candidato a MRC-Alfonsino es de 88,08  $\mu\text{m}$ , lo que asegura que la distribución de tamaños para un material de referencia es adecuada, ya que, según literatura (Kramer, 2001), el diámetro medio máximo debe ser de aproximadamente 125  $\mu\text{m}$  para no presentar problemas de homogeneidad.

### 3.4. NÚMERO DE MUESTRAS A MEDIR

Se utilizó la fórmula (4), tomando un total de botellas obtenidas,  $N = 110$ :

$$h = 3 * \sqrt[3]{N}$$

$$h = 3 * \sqrt[3]{110} = 14,38 = 15 \text{ unidades}$$

Las 15 botellas necesarias para los análisis se eligieron aleatoriamente, luego se codificaron y utilizaron para la determinación de la homogeneidad de las muestras y para la cuantificación del analito mercurio.

### 3.5. HOMOGENEIDAD DEL MATERIAL

a) *Homogeneidad entre unidades*: se realizó mediante la técnica de AAN. La determinación del analito mercurio, según esta técnica, se realiza mediante la cuantificación del isótopo  $Hg^{203}$ , el cual es un núclido inestable de vida media de 46,61 días, posee una energía de 279,20 KeV y su abundancia es del 81,46%.

Su reacción, según la fórmula (1), se escribe  $Hg^{202} (n, \gamma) Hg^{203}$ .

Se analizaron las 15 muestras seleccionadas del candidato a MRC y de cada unidad se obtuvieron 6 réplicas, formando un total de 90 muestras a analizar.

El Anexo 14 contiene las evaluaciones estadísticas para determinar la homogeneidad del material, realizadas en el programa computacional Statgraphics Plus 4.0.

La guía ISO 35 (2006) entrega las siguientes fórmulas:

$$s_{bb}^2 = \frac{MS_{entre} - MS_{dentro}}{n_o} \quad (8)$$

, donde

$s_{bb}^2$  = varianza debida a la heterogeneidad entre unidades

$s_{bb}$  = desviación estándar debido a heterogeneidad entre unidades

$MS_{\text{entre}}$  = cuadrado de las medias (mean square) entre unidades

$MS_{\text{dentro}}$  = cuadrado de las medias (mean square) dentro de las unidades

$n_o$  = número de replicados

$$s_{bb}^2 = \frac{MS_{\text{dentro}} - MS_{\text{entre}}}{n_o} = \frac{0,000859069 - 0,0000650568}{6} = 1,32 \text{ E}^{-4}$$

$$s_{bb} = \sqrt{s_{bb}^2} = \sqrt{1,32 \text{ E}^{-4}} = 1,15 \text{ E}^{-2} \text{ mg/kg}$$

En estudios de homogeneidad  $s_{bb}^2 = u_{bb}^2$ .

- o Coeficiente de variación debido a heterogeneidad entre unidades:

$$CV_{bb} \% = \frac{s_{bb}}{\text{valor de propiedad total obtenido del análisis}} \quad (9)$$

$$CV_{bb} \% = (1,15 \text{ E}^{-2} / 0,63) * 100 = 1,83 \%$$

- b) *Homogeneidad dentro de las unidades:*

$s_{wb}$  = desviación estándar debido a heterogeneidad dentro de unidades

$s_r$  = desviación estándar de repetibilidad

$$s_{wb} = s_r = \sqrt{MS_{\text{dentro}}} = \sqrt{0,0000650568} = 8,07 \text{ E}^{-3} \text{ mg/kg}$$

Según indica la guía ISO 35, para que un MR(C) se acepte como homogéneo, la desviación estándar debida a la heterogeneidad dentro de cada unidad ( $s_{bb}$ ) debe ser menor a la desviación estándar debida a la heterogeneidad entre las unidades ( $s_{wb}$ ), independiente que la evaluación estadística indique un P-value menor o igual a 0,05, lo que determinaría que existen diferencias significativas entre las muestras.

En este caso, la desviación estándar debida a la heterogeneidad dentro de cada unidad fue de  $8,07 \text{ E}^{-3} \text{ mg/kg}$  y la desviación estándar debida a la heterogeneidad entre las unidades de  $1,15 \text{ E}^{-2} \text{ mg/kg}$ , por lo que se cumple el parámetro establecido en la norma 35.

Un factor determinante en el análisis, fue que se prefirió no eliminar ningún valor para así obtener la homogeneidad real de la muestra, lo que podría haber entregado una mejor evaluación.

- Coeficiente de variación de repetibilidad del método AAN:

$$CV_{rAAN} \% = \frac{S_{wb}}{\text{Valor de propiedad total obtenido}} \quad (10)$$

$CV_{rAAN} \% = (8,07 E^{-3} / 0,63) * 100 = 1,28 \%$
---

Esta guía también hace referencia a que un método se considera de repetibilidad aceptable cuando éste entrega una variación menor a la entregada por la heterogeneidad entre las unidades.

En este caso, el CV del método AAN fue de un 1,28% y el CV debido a la heterogeneidad entre unidades fue de 1,83%, por lo tanto, la repetibilidad del método se considera aceptable.

Si esto no se cumpliera se deben aplicar diferentes fórmulas matemáticas para determinar la incertidumbre atribuible al método.

### **3.6. MATERIALES DE CONTROL**

Los cinco materiales de referencia biológicos (Anexo 12) fueron utilizados como materiales de control interno en el método de AAN.

A los materiales de control se les aplicó el mismo procedimiento que a las muestras, y una vez obtenida su caracterización en cuanto a la fracción de masa de mercurio total, ésta se utilizó para determinar la exactitud de la técnica y mantener así la trazabilidad a patrones internacionales.

### 3.7. FRACCIÓN DE MASA DEL ANALITO EN BASE SECA

En la caracterización de los candidatos a materiales de referencia es muy recomendable usar múltiples métodos y diversos laboratorios. Tanto los métodos como los laboratorios deben realizar sus mediciones trazables a las especificaciones (ISO, 2006).

Por esto, la caracterización del elemento mercurio en el candidato a MRC-Alfonsino se realizó mediante una ronda de inter comparación con 7 laboratorios, utilizando las técnicas de AAN y EAA.

El Anexo 17 contiene las evaluaciones estadísticas para determinar la fracción de masa del analito y su incertidumbre asociada. Ambas evaluaciones fueron realizadas en el programa computacional Statgraphics Plus 4.0. Del Anexo se obtienen los siguientes resultados:

Gran media = 0,63 mg / kg = Valor de propiedad convencional

$u_{char}$  = incertidumbre debida a la caracterización

$$u_{char} = \sqrt{\left(\frac{s^2_L}{p}\right) + \left(\frac{s^2_r}{np}\right)} \quad (11)$$

$s^2_r$  = varianza de repetibilidad interlaboratorios =  $MS_{dentro} = 2,4 E^{-4}$

$p$  = número de grupos (laboratorios) = 7

$n$  = número de repeticiones = 9 (cuando no falta ningún dato  $n = n_o$ )

$$s^2_L = \text{varianza entre laboratorios} = \frac{MS_{entre} - MS_{dentro}}{n_o} \quad (12)$$

$$s^2_L = \frac{0,00291931 - 0,000239559}{9} = 2,98 E^{-4}$$

Reemplazando la fórmula (11), se obtiene:

$$u_{char} = \sqrt{(4,2536 E^{-5}) + (3,8032 E^{-6})} = 6,81 E^{-3} \text{ mg/kg}$$

- Coeficiente de variación de interlaboratorios:

$$CV_L \% = \frac{s_L^2}{\text{valor de propiedad total obtenido}} \quad (13)$$

$$CV_L \% = (2,98 E^{-4} / 0,63) * 100 = 0,047 \%$$

De la fórmula (5) se obtiene:  $uMRC = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2}$

$u_{lts}$  y  $u_{sts}$  = incertidumbre debida a la estabilidad a largo y corto plazo respectivamente.

Considerando que los estudios de estabilidad requieren de un largo período de tiempo y que la vida útil esperada para este MRC es de aproximadamente 3 años, se decidió asumir que la suma de las contribuciones de la estabilidad a largo y corto plazo sería de un 1% con respecto al valor de propiedad determinado en la caracterización. Este porcentaje representa, según diversos estudios previos realizados en la CCHEN, una contribución bastante mayor (de seguridad) que la obtenida por efectos de estabilidad.

Es importante mencionar que las muestras enviadas para análisis al extranjero, durante la ronda de ínter comparación, se transportaron a temperatura ambiente y los resultados de estos laboratorios no presentaron diferencias con respecto a los demás, por lo que no habría ningún motivo para pensar que la contribución por estabilidad sería mayor a la que se está asumiendo.

Entonces,  $u_{lts}^2$  y  $u_{sts}^2 = (0,63 (0,01))^2 = (0,0063)^2$

Por lo tanto la incertidumbre combinada de la caracterización quedaría:

$$uMRC = \sqrt{(6,81 E^{-3})^2 + (1,32 E^{-4})^2 + (6,3 E^{-3})^2} = 8,28 E^{-2} \approx 0,01 \text{ mg/kg}$$

Para un nivel de confianza del 95% se obtiene  $k=2$

$$U = uMRC * k = 0,01 * 2 = 0,02 \text{ mg /kg}$$

- Coeficiente de variación de la incertidumbre combinada:

$$CV_u \% = \frac{u}{\text{valor de propiedad total obtenido}} \quad (14)$$

$CV_u \% = (0,01 / 0,63) * 100 = 1,59 \%$
---

Finalmente, se obtiene el valor de propiedad = **0,63 ± 0,02 (mg/kg)** con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados anteriores se encuentran en base al material realizado (base seca).

Si se compara la incertidumbre expandida del valor de propiedad del candidato a MRC-Alfonsino con los cinco controles biológicos internacionales utilizados en los análisis, se observa que la incertidumbre declarada para estos últimos es bastante mayor a la declarada para el Alfonsino (Anexo 12), concluyendo que la dispersión y, por lo tanto, también la heterogeneidad de los valores del análisis de mercurio en Alfonsino es menor a la obtenida en los materiales de referencia extranjeros.

### 3.7.1. Fracción de masa de mercurio en base húmeda

Del Anexo 9 se obtiene que 1 g peso húmedo de matriz contiene 0,23 g masa seca.

Por lo tanto, el valor de propiedad obtenido  $0,63 \pm 0,02$  (mg/kg) llevado a base húmeda es igual a:

0,63 mg Hg  $\rightarrow$  1 kg peso seco

x mg  $\rightarrow$  0,23 kg peso seco  $x = 0,15$  (mg/kg)

La desviación estándar combinada del valor de propiedad en base seca es 0,01 mg/kg, al transformarla a base húmeda queda:

0,01 mg Hg  $\rightarrow$  1 kg peso seco

x mg  $\rightarrow$  0,23 kg peso seco  $x = 0,002$  (mg/kg)

A esta desviación estándar se le debe agregar la proveniente de la repetibilidad de la medición de determinación de contenido inicial de agua (1,33%), por lo que nos queda una desviación estándar total en base húmeda:

$$U_{bh} = \sqrt{(0,002)^2 + (0,0133)^2} = \sqrt{0,000184} = 0,01 \text{ (mg/kg)}$$

Finalmente, la fracción de masa de mercurio en base húmeda es igual a:

Valor de propiedad en base húmeda:  **$0,15 \pm 0,01$  (mg/kg)**

La reglamentación tanto nacional (Reglamento Sanitario de los Alimentos) como internacional (Codex Alimentarius, FDA, etc.) entrega límites de concentración de mercurio en peces entre 0,5 y 1,5 (mg/kg) en base húmeda. Los valores varían dependiendo del tamaño y tipo de pez.

Basándose en estos valores, la fracción de masa determinada para el MRC está dentro de los límites aceptables para la cuantificación de este elemento, ya que se recomienda que la concentración sea menor a la reglamentación y por sobre a los límites de detección de los métodos utilizados (0,01 ng Hg para equipo Milestone y 0,02 ppm para equipo reactor de AAN).

### 3.8. MASA DE MUESTRA MÍNIMA REPRESENTATIVA PARA CADA ANÁLISIS

La determinación de homogeneidad se realizó mediante la técnica de AAN, utilizando una la masa para el análisis de 300 mg de polvo seco.

La caracterización del material se realizó mediante la técnica de EAA, donde la NCh 2667 (2001) indica que la cantidad de muestra húmeda necesaria para el análisis es de 5 g, lo que corresponde, según el Anexo 18, a 1 g aproximado de material seco.

La guía ISO 35 establece que un MR(C) se acepta como homogéneo cuando la contribución atribuida a la heterogeneidad (obtenida por la técnica de AAN) es menor en relación a la contribución de la caracterización (obtenida por AAN y EEA).

De acuerdo a lo anterior y utilizando masas diferentes para cada técnica, se obtiene que la contribución debida a la heterogeneidad es de  $1,15 \text{ E}^{-2} \text{ mg/kg}$  y la contribución debida a la caracterización tan sólo de  $6,81 \text{ E}^{-3} \text{ mg/kg}$  por lo tanto, el candidato a MRC-Alfonsino no sería homogéneo. Debido a esto, se debe hacer una corrección a la incertidumbre debida a la heterogeneidad, igualando las masas a 1 g según lo establece la NCh 2667 para EAA.

Para poder comparar ambas variaciones es necesario igualar estas masas.

De la fórmula (6) se obtiene que:

$m$  = Masa pequeña de material utilizado = 300 mg

$M$  = Masa grande, mínima cantidad representativa de material utilizado = 1000 mg

$S_{Hm}$  = Variabilidad debida a heterogeneidad utilizando la masa pequeña = 1,83%

$S_{HM}$  = Variabilidad debida a heterogeneidad utilizando la masa grande = X

$$\frac{S_{Hm} (\%)}{S_{HM} (\%)} = \sqrt{\frac{M}{m}}$$

$$\frac{(1,83)^2}{X^2} = \frac{1000}{300}$$

$$X = S_{HM} = 1 \% \text{ Variabilidad debida a heterogeneidad utilizando masa de 1 g.}$$

Una variabilidad debida a heterogeneidad del 1% entrega un  $s_{bb}$  igual a:

$$1\% = (s_{bb} / 0,63) * 100 \quad \rightarrow \quad s_{bb} = 6,3 \text{ E}^{-3} \text{ mg/kg.}$$

De lo anterior se determina que, al utilizar una masa de 1 g en la técnica de AAN, se obtiene una incertidumbre debida a heterogeneidad de  $6,3 \text{ E}^{-3} \text{ mg/kg}$ , valor menor a la incertidumbre entregada por la caracterización ( $6,81 \text{ E}^{-3}$ ), por lo tanto, se cumple que el material de referencia certificado Alfonsino sea homogéneo, y se establece que la cantidad de muestra representativa para el MRC-Alfonsino es de 1 g para las dos técnicas utilizadas.

**3.9.****RESUMEN DE RESULTADOS**

Tabla 4: resultados obtenidos en la preparación del MRC-Alfonsino.

Parámetro	Valor
Contenido de agua inicial en matriz	77,03 g de agua /100 g de Alfonsino
Humedad residual MRC	2,4 g de agua /100 g de MRC
Tamaño medio de partículas	88,08 $\mu\text{m}$
Número de muestras a medir	15 unidades
Incertidumbre debida a heterogeneidad (masa = 300 mg)	1,15 E <sup>-2</sup> mg/kg
Incertidumbre debida a heterogeneidad (masa = 1 g)	6,3 E <sup>-3</sup> mg/kg
Incertidumbre debida a la caracterización	6,81 E <sup>-3</sup> mg/kg
Incertidumbre debida a la estabilidad	6,3 E <sup>-3</sup> mg/kg
Incertidumbre combinada	0,01 mg/kg
Valor de propiedad del analito (base seca)	0,63 $\pm$ 0,02 mg/kg
Valor de propiedad del analito (base húmeda)	0,15 $\pm$ 0,01 mg/kg

## CAPÍTULO 4

# **CONCLUSIONES**

#### 4.1.

### CONCLUSIONES

La elaboración de un MR(C) requiere amplios conocimientos sobre los materiales de referencia y sus propiedades, sobre los métodos de análisis y métodos estadísticos para lograr un correcto procesamiento e interpretación de la información experimental. La combinación de todas estas aptitudes es lo que hace que la preparación y certificación de los MR(C)s sea un proceso tan complejo.

Con respecto al estudio del MRC-Alfonsino se concluye que:

- La distribución de partículas, es apropiada, ya que el 90% de la distribución corresponde a tamaños bajo 186,97  $\mu\text{m}$ , lo que nos confirma que el material es homogéneo en este aspecto. En vista de esto, se puede decir que una buena molienda y tamizado del material son pasos fundamentales en la elaboración para que se cumplan los requisitos que exigen los laboratorios para aceptar un MR(C).
- En la determinación de la homogeneidad del analito mercurio en el material Alfonsino se encontró que, mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), las especificaciones de la guía ISO 35 se cumplen en un nivel de confianza del 95%, aceptándose el material como altamente homogéneo.
- De lo anterior, se puede afirmar que al aumentar la masa de muestra necesaria para el análisis de homogeneidad a 1 g, es posible reducir la variación atribuible a la heterogeneidad del material hasta una contribución del 1%.
- Las técnicas de AAN y EAA son simples, rápidas y adecuadas para la determinación de concentraciones bajas de metales en muestras sólidas, del orden de las milésimas de ppm. Uno de los beneficios de haber realizado la cuantificación del mercurio utilizando dos técnicas con diferentes principios

analíticos, es que el uso del valor de propiedad obtenido para el MRC-Alfonsino no queda restringido a un sólo método de análisis.

- Referente a la estabilidad del material, se utilizaron estudios previos de estabilidad en materiales de referencia hidrobiológicos para concluir que, al almacenarlo a temperaturas de congelación (-30°C), la vida útil esperada del producto es de 3 años. Transcurrido este período, es necesario volver a repetir los ensayos de estabilidad. La vida útil esperada se declara para condiciones específicas de almacenamiento. De no cumplirlas, no se asegura la estabilidad del material durante este tiempo.
- De acuerdo a los objetivos propuestos, se concluye que el material candidato Alfonsino es altamente homogéneo para el analito mercurio (Hg) utilizando la masa mínima representativa (1 g). Se confirma que el tamaño de partícula es apropiado y que las propiedades del material se mantienen estables en condiciones determinadas de almacenamiento, por lo que es posible concluir que cumple los requisitos necesarios para declararse como MRC.
- Por último, los resultados de fracción de masa de mercurio obtenidos en el estudio son comparables a los obtenidos por diversos laboratorios competentes, con diferentes técnicas analíticas. Se puede afirmar entonces que se acepta la hipótesis establecida y que el MRC-Alfonsino cumple con las características físicas y químicas requeridas en la guía ISO 35.

## CAPÍTULO 5

# REFERENCIAS

## 5.1

## REFERENCIAS

- AQUA, Aqua Noticias. 2005. [en línea] [http://www.aqua.cl/ver\\_noticias.php?Chile](http://www.aqua.cl/ver_noticias.php?Chile).
- APA, Asociación de Productores Avícolas de Chile. 2006. [en línea] [http://www.apa.cl/index/tendencias\\_det.asp?id\\_tendencia=24](http://www.apa.cl/index/tendencias_det.asp?id_tendencia=24).
- BECERRA, M. 2006. Exposición sobre Caracterización de Tamaño de Partículas, Comisión chilena de Energía Nuclear. Santiago, Chile.
- BIEVRE, P. 2005a. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry [en línea] [http://www.iupac.org/publications/ci/2005/2705/ud1\\_bievre.html](http://www.iupac.org/publications/ci/2005/2705/ud1_bievre.html)
- BIEVRE, P. 2006b. Accreditation and Quality Assurance, Journal for Quality, comparability and reability in Chemical Measurements. “On (Certified) Reference Materiales”. Volumen 10 – Número 9, Enero 2006.
- BRAVO A. 2003. “Validación de una metodología para la detección de residuos de metilmercurio en tejido muscular de salmón”. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- CASTELAZO, I. 2002. “Uso de la distribución t en la estimación de la incertidumbre de la medición”. CENAM, Centro Nacional de Metrología. México.
- CCHEN, Comisión Chilena de Energía Nuclear. 2000. “Determinación del contenido de Mercurio en el Material de Referencia MR-CCHEN-001, Albacora”. Santiago, Chile.
- CCHEN, Comisión Chilena de Energía Nuclear. 2002. “Folleto Unidad de Metrología Química”. Santiago, Chile.
- CCHEN, Comisión Chilena de Energía Nuclear. 2006. [en línea] <http://www.cchen.cl>
- CEM, Centro Español de Metrología. 2006. [en línea] [http://www.cem.es/cem/es\\_ES/metrologia/SME.pdf](http://www.cem.es/cem/es_ES/metrologia/SME.pdf). España.
- CENAM, Centro Nacional de Metrología. 2002. “Trazabilidad en las mediciones químicas”. México.

- CENAM, Centro Nacional de Metrología. 2004. “Guía para estimar la incertidumbre de la medición”. México.
- CODEX ALIMENTARIUS. 2005. Directrices para establecer los niveles de referencia para el metilmercurio en pescado. [en línea] <http://www.codexalimentarius.net/search>.
- COMISIÓN EUROPEA, BCR/48/93. 1994. “Guidelines for the production and certification of BCR reference materials”.
- DRASCH, G. 1994. Institute of inorganic chemistry. “Handbook on metals in clinical and analytical chemistry”. University of Basel, Switzerland. Capítulo 39.
- EMONS, H. 2006. Accreditation and Quality Assurance, Journal for Quality, comparability and reability in Chemical Measurements. “The RM family – Identification of all of its members”. Volumen 10 – Número 12, Marzo 2006.
- EPA, Environmental Protection Agency. 2006. [en línea] <http://www.epa.gov/mercury/about.htm>.
- EURACHEM, 1995. [en línea] [www.measurementuncertainty.org/mu.html](http://www.measurementuncertainty.org/mu.html). Consulta Agosto, 2006.
- FERNÁNDEZ, 2005. 9th International Mine Water Congress “A rapid and robust method for the organic mercury determination in Hg mine waters”. España.
- HELMAN, J. 2001. “Farmacotecnia Teórica y Práctica” Tomo 3.
- ILAC, International Laboratory Accreditation Cooperation. ILAC-G12:2000, Guidelines for the requirements for the competence of Reference Materials Producers.
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh 2053. Of 2000, Norma Chilena Oficial 2000. “Guía para la planificación de laboratorios de ensayo y metrología”. Chile.
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh2446.Of.1999. Norma Chilena Oficial 1999. “Guía para la validación de métodos de ensayo - Principios y conceptos generales”.
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh 2448. Of 1998, Norma Chilena Oficial 1998a. “Directrices sobre sistemas de calidad para la producción de materiales de referencia”. Santiago, Chile.

- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh 2450. Of 1998, Norma Chilena Oficial 1998b. “Vocabulario de términos fundamentales y generales de metrología”.
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh 2667. Of 2001, Norma Chilena Oficial 2001a. “Productos hidrobiológicos – Determinación de mercurio – Método espectrofotométrico de absorción atómica por generación de vapor frío”. Santiago, Chile.
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh 2670. Of2001, Norma Chilena Oficial. 2001b. “Productos hidrobiológicos – Determinación de humedad”. Santiago, Chile.
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh 2755/1. Of2003, Norma Chilena Oficial 2003. “Guía para la cuantificación y expresión de la incertidumbre en el análisis químico. Parte 1: Fundamentos”. Santiago, Chile
- INN, Instituto Nacional de Normalización. NCh – ISO 17025. Of 2001, Norma Chilena Oficial. 2001c. “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. Santiago, Chile.
- ISO, International Organization for Standarization. 1992. Guide 30:1992 “Terms and definitions used in connection with reference materials”. Segunda Edición.
- ISO, International Organization for Standarization. 2000a. Guide 33:2000 “Uses of certified materials”.
- ISO, International Organization for Standarization. 2000b. Guide 34:2000. “General requirements for the competence of reference materials producers”. Segunda edición.
- ISO, International Organization for Standarization. 2006. Guide 35:2006 “Certification of Reference Materials – General and statistical principles”. Tercera Edición.
- ISO, International Organization for Standarization. 1993. DGuide 99999.1993 “International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM). Segunda Edición.
  - KRAMER, K. “et al”. 2001. “Practical Manual for the Production of Laboratory Reference Materials”. Editorial Mermayde, Holanda.
  - MARKERT, B. 1994. “Enviornmental sampling for trace analysis”. Alemania.
  - MINSAL, Ministerio de Salud. 2002. “Lista de sustancias peligrosas para las Salud”.

- NIST, National Institute of Standards and Technology. 1994. NIST Technical Note 1297 “Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results”.
- NRDC, Natural Resources Defense Council. 2005. [en línea] <http://www.nrdc.org/health/effects/mercury/espanol/protect.asp>.
- OAE, Organismo de Acreditación Ecuatoriano. 2006. [en línea] <http://www.merck.com.co/meca/site/wmsp.nsf/vstAdmDocDow/TRAZABILIDAD/.pdf>.
- PASTOR, M. 2004. Memoria para optar al título de Ingeniera en química. “Caracterización física y química de un material de origen vegetal candidato a material de referencia para análisis químico”. Santiago, Chile.
  - PESCAHILE. 2005. [en línea] <http://www.pescachile.cl/espanol>.
  - PNUMA, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 2002. “Evaluación Mundial sobre el Mercurio”. Ginebra, Suiza.
    - PRT-DAN-LAQ, Departamento de Activación Neutrónica. Comisión Chilena de Energía Nuclear. 2005. “Determinación de Selenio y Mercurio en muestras de aguas puras mediante EAA con generación de hidruros”. Santiago, Chile.
- RAMOS, C. “et al”. 2000. “Nivel de Contaminación por metilmercurio en la región de la Mojana”. Universidad de Los Andes. Bogotá, Colombia.
- RICO, V. “et al”. 2001. “Edad y crecimiento del besugo americano *Beryx splendens* Lowe, 1834 (Osteichthyes, Berycidae) en aguas de las islas Canarias”. Instituto Español de Oceanografía, España.
  - RNM, Red Nacional de Metrología de Chile. 2005. [en línea] <http://www.metrologia.cl/inicio/index.act>.
  - RSA, Reglamento Sanitario de los Alimentos. 2006. [en línea]. <http://www.tecnoalimentos.cl/html2/Tit04.html#t4p1>. Santiago, Chile.
  - SEPÚLVEDA, S. 2000. Memoria para optar al título de Ingeniero de Ejecución Químico. “Determinación de la homogeneidad de muestras para Análisis Químico y Materiales de Referencia”. Universidad de Santiago, Chile.

- SERNAPESCA, Servicio Nacional de Pesca. 2005. [en línea] [http://www.sernapesca.cl/paginas/nuestra\\_institucion/objetivos.php?c=001002002](http://www.sernapesca.cl/paginas/nuestra_institucion/objetivos.php?c=001002002).
- SUBPESCA, Subsecretaría de Pesca. 2006. [en línea] <http://www.subpesca.cl>. “Informe Técnico (R. PESQ.) N° 117, Cuota Global Anual de Captura de Alfonsino (*Beryx splendens*), año 2006”. Valparaíso, Chile.
- TDR, Tesis Doctorales en Red. 2005. [en línea]. España. [http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UC/AVAILABLE/TDR-0810105-1351.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UC/AVAILABLE/TDR-0810105-1351.pdf)
- UE, Unión Europea. 2001. “Diario Oficial de las Comunidades Europeas- Reglamento (CE) N° 466/2001 de la Comisión. Por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios”. Bruselas.
- VALCÁRCEL, M. y Ríos A. 1992. “La calidad en los laboratorios analíticos”. Editorial Reverté, España.

## CAPÍTULO 6

# **ANEXOS**

6.1.

**ANEXOS**

**Anexo 1 – Campos de la Metrología**

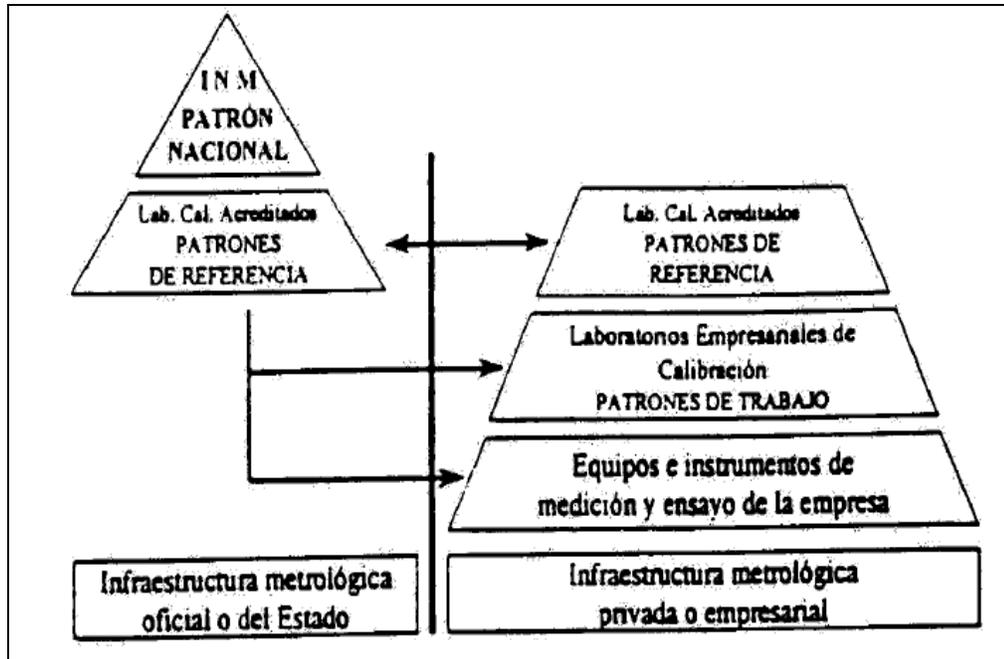
La Metrología Científica está dividida por el Bureau Internacional de Pesas y Medidas (BIPM) en 9 campos técnicos: Masa; Electricidad; Longitud; Tiempo y Frecuencia; Termometría; Radiaciones Ionizantes y Radioactividad; Acústica; Cantidad de Sustancia; Fotometría y Radiometría.

El MRC-Alfonsino pertenece a la categoría de “Cantidad de Sustancia”.

MAGNITUD	SUBCAMPO	Patrones e instrumentos destacables
CANTIDAD de SUSTANCIA	Química Ambiental	Materiales de Referencia Certificados, espectrómetros de masas, cromatógrafos
	Química Clínica	
	Química de Materiales	Materiales puros, materiales de referencia certificados
	Química de los Alimentos	Materiales de Referencia Certificados
	Bioquímica	
	Microbiología	
	Medida de pH	

Fuente: CEM, 2006.

## Anexo 2 - Cadena de Trazabilidad



Fuente: OAE, 2006

### ◦ SI, unidades básicas

Cantidad	Unidad	Símbolo
Longitud	metro	m
Masa	kilogramo	kg
Tiempo	segundo	s
Corriente eléctrica	amperio	A
Temperatura Termodinámica	grado kelvin	°K
Intensidad lumínica	candela	cd

Fuente: OAE, 2006.

## Anexo 3 - Definiciones

- a) *Magnitud*: atributo de un fenómeno, cuerpo o sustancia que es susceptible de ser distinguido cualitativamente y determinado cuantitativamente (INN, 1998b).
- b) *Mensurando*: magnitud específica que está sujeta a medición.
- c) *Valor (del mensurando)*: expresión cuantitativa de una magnitud particular, generalmente en forma de una unidad de medida multiplicada por un número.
- d) *Valor verdadero (del mensurando)*: valor consistente con la definición de una magnitud particular dada. Este valor se obtendría por una medición perfecta. Todo valor verdadero es por naturaleza indeterminado, por lo que se prefiere utilizar el valor verdadero convencional, que es el valor atribuido a una cantidad particular y aceptado algunas veces por convención al tener una incertidumbre apropiada para un uso dado (Eurachem, 1995).
- e) *Media aritmética ( $\bar{x}$ )*: valor promedio obtenido de  $n$  resultados de una muestra.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- f) *Desviación estándar muestral (s)*: estimado de la desviación estándar poblacional normal ( $\sigma$ ) de una muestra con  $n$  resultados. La desviación estándar es una medida del grado de dispersión de los datos del valor promedio. Una desviación estándar grande indica que los puntos están lejos de la media y una desviación pequeña indica que los datos están agrupados cerca de la media.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- g) *Desviación estándar de la media muestral ( $s_{\bar{x}}$ )*: se le conoce también como error estándar (Eurachem, 1995).

Para probabilidad t- Student, con  $\sigma$  desconocida:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Para probabilidad normal, con  $\sigma$  conocida:  $\sigma_x = \sigma / \sqrt{n}$

h) *Desviación estándar relativa porcentual (DER%)*: se le conoce también como Coeficiente de Variación (CV). Es la desviación estándar muestral dividida en la media:

$$DER\% = (s / \bar{x}) * 100$$

i) *Error (de una medición)*: es el resultado de la medición menos el valor verdadero convencional del mensurando. No debe confundirse con la incertidumbre, ya que el error es un valor, la incertidumbre un rango (Eurachem, 1995).

j) *Error aleatorio*: resultado de una medición menos la media de un número infinito de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de repetibilidad. Es igual al error menos el error sistemático. Como no se puede realizar un número infinito de mediciones, el error aleatorio sólo se puede estimar. Este error resulta de las variaciones impredecibles de las magnitudes de influencia. No se puede compensar mediante corrección, pero se puede reducir al incrementar el número de mediciones (INN, 2003).

k) *Error sistemático*: medida que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de repetibilidad menos un valor verdadero del mensurando. Es igual al error menos el error aleatorio. Al igual que el valor verdadero, no puede ser conocido completamente. Este error permanece constante o varía en forma predecible, por lo que es independiente del número de mediciones (Ej. Falta de un blanco de reactivos en un ensayo o inexactitudes en la calibración de un instrumento).

l) *Validación de un método de ensayo*: confirmación, mediante examen y entrega de evidencia objetiva, de que el método es apto para un uso previsto. Un estudio de validación considera determinar todos o algunos de los siguientes parámetros: precisión, sesgo, linealidad, límite de detección, robustez y selectividad (INN, 1999).

- m) *Sesgo (bias)*: error de medición sistemático con respecto a un valor de referencia. Se determina mediante el uso de MR(C)s y es importante para establecer la trazabilidad a patrones reconocidos. Se expresa como el valor observado dividido por el esperado. La incertidumbre asociada a la determinación del sesgo es un componente esencial de la incertidumbre global. Cuando el sesgo no es significativo comparado a la incertidumbre combinada, se puede descartar (Eurachem, 1995).
- n) *Linealidad*: generalmente no se cuantifica, pero se verifica mediante pruebas de significancia de no linealidad y se corrige usando funciones de calibración o se elimina eligiendo un rango de operación más restringido (INN, 2003).
- o) *Límite de detección*: generalmente se determina sólo para establecer el punto más bajo del rango en la operación de un método y no tiene relevancia directa en la estimación de la incertidumbre (INN, 2003).
- p) *Robustez*: propiedad analítica de un proceso de medida química que describe su sensibilidad cuando se varían ligeramente las condiciones experimentales en las que se desarrolla (INN, 2003).
- q) *Selectividad*: los estudios de selectividad investigan los efectos de los probables interferentes frente al analito requerido. Los interferentes se agregan tanto a las muestras blanco como a muestras fortificadas (INN, 2003).
- r) *Fortificar (spiked)*: acción de añadir un analito, sustancia, matriz química o un MRC a una muestra en cualquier etapa de un análisis químico para realzar la respuesta del sistema de medición con un objetivo determinado (INN, 2003).
- s) *Patrón o estándar primario*: estándar ampliamente reconocido por tener la más alta calidad metrológica y por poseer un valor de propiedad que se acepta sin ninguna referencia a otros estándares de la misma calidad (ISO, 1992).

#### Anexo 4 - Pez Alfonsino



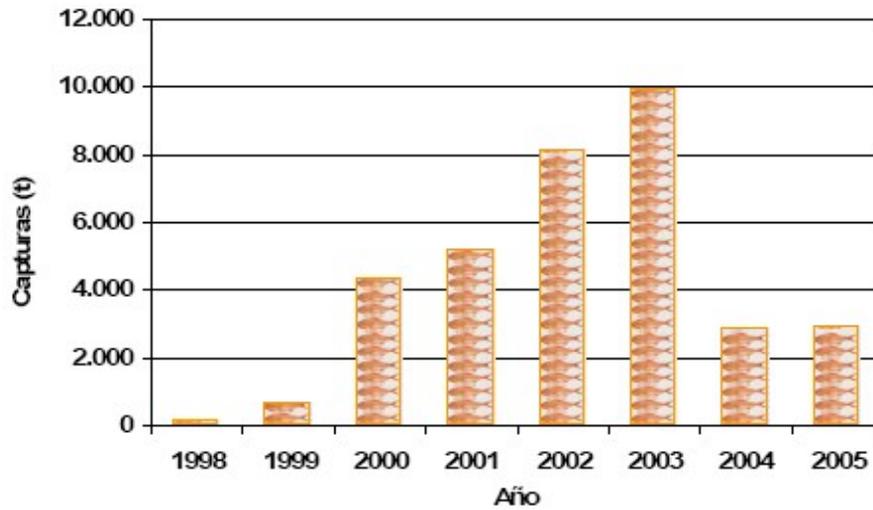
Fuente: Pescachile, 2005.

- **Información nutricional por cada 100 grs. de Alfonsino con piel, sin espinas**

Valor energético (kcal)	176,9
Grasa total (g)	12,5
Colesterol (mg)	0,04
Proteínas (g)	15,6
Sodio (mg)	56,5
Hierro (mg)	0,18
Calcio (mg)	8,20
Fósforo (mg)	208

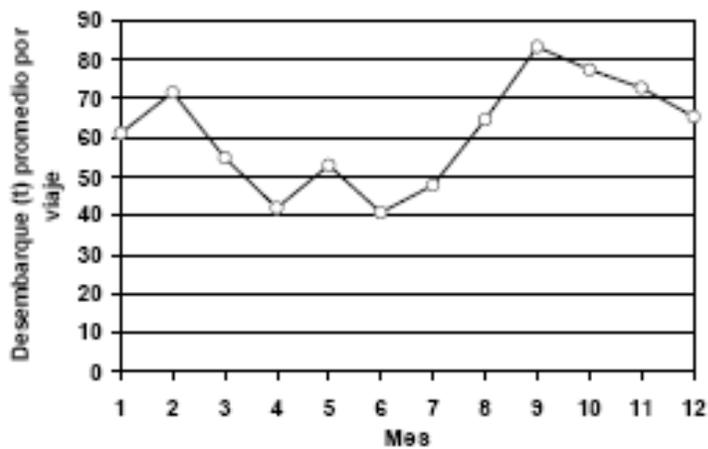
Fuente: Friosur, 2006

- **Desembarques (ton) anuales de alfonsino por la flota nacional, 1997-noviembre 2005 (a partir de Anuarios Estadísticos de Pesca)**



Fuente: Subpesca, 2006.

- **viaje**



**Desembarques mensuales por promedio de Alfonsino, 1997-2004**

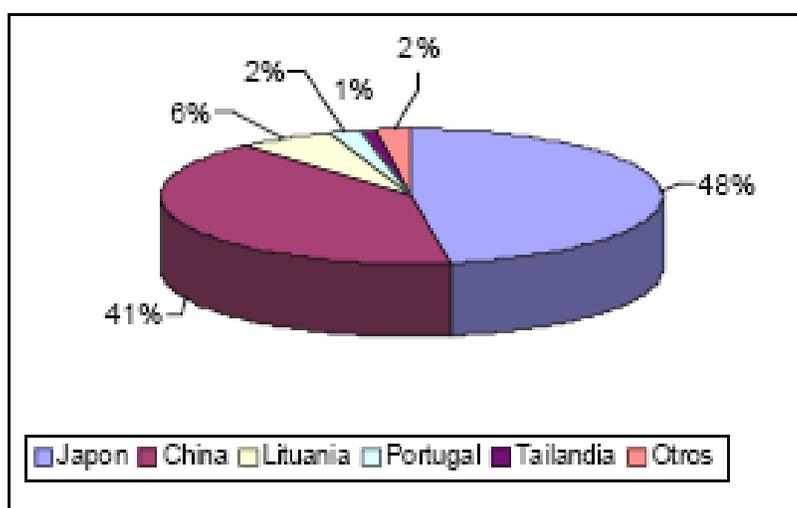
Fuente: Sernapesca, 2005.

- **Evolución de la producción de Alfonsino (ton)**

Producto / año	2000	2001	2002	Rendimiento Promedio(%) 2002
<b>Congelados</b>	2.012	1.843	2.189	54
<b>Fresco Refrigerado</b>	5	30	139	76
<b>Otros</b>	0	0	0	-

Fuente: Subpesca, 2006.

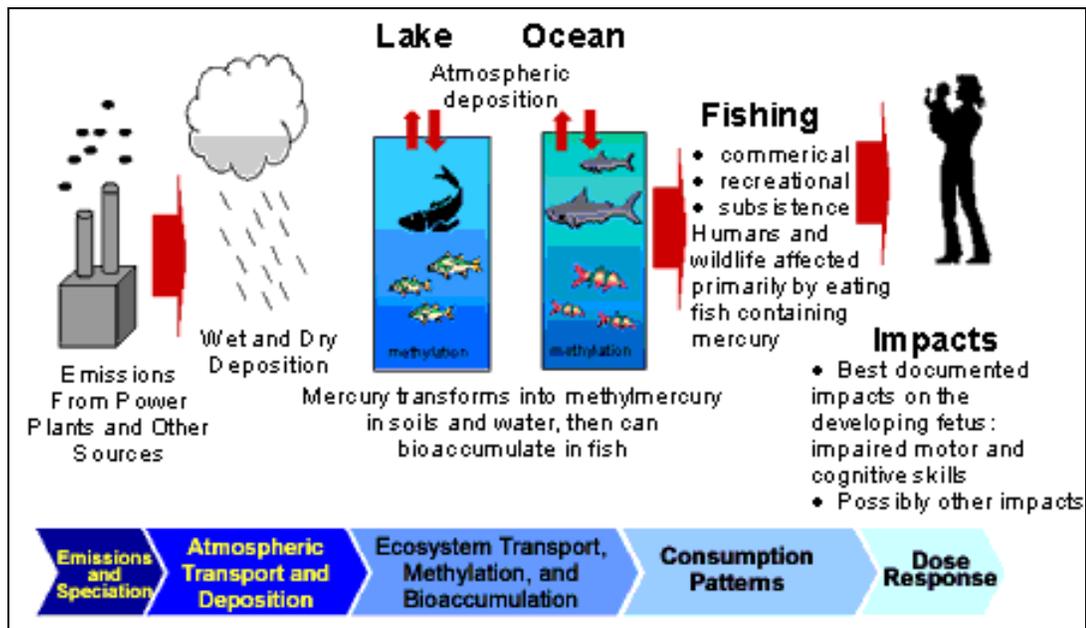
- **Exportación Alfonsino 2003**



Fuente: Subpesca, 2006.

## Anexo 5 - Mercurio

- Ingreso del Me-Hg<sup>+</sup> al ambiente



Fuente: EPA, 2006

- Movimiento del Me-Hg<sup>+</sup> en la cadena trófica



Fuente: EPA, 2006

◦ **Niveles de referencia de Me-Hg<sup>+</sup> en peces según Codex Alimentarius**

CAC/GL 7	Página 1 de 1
<b>NIVELES DE REFERENCIA PARA EL METILMERCURIO EN EL PESCADO CAC/GL 7-1991</b>	
<p>Los niveles de referencia del Codex para el metilmercurio en el pescado han sido adoptados por la Comisión del Codex Alimentarius en su 19º período de sesiones (1991), en el entendimiento de que los niveles de referencia se mantendrían sujetos a la revisión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos y del Comité del Codex sobre Pescado y Productos Pesqueros, especialmente en lo referente a la identificación de especies de peces depredadores a los que habían de aplicarse niveles de referencia más elevados.</p>	
<b>Nivel de referencia Metilmercurio</b>	
Todos los pescados con excepción de los depredadores	0,5
mg/kg	
Pescados depredadores (como tiburón, pez espada, atún, lucio y otros)	1
mg/kg	

◦ **Riesgo de contaminación con mercurio en diversos peces**

HIGHEST MERCURY	LOWER MERCURY	LOWEST MERCURY
<p><b>AVOID EATING:</b></p> <p>Grouper*                      Shark*</p> <p>Marlin*                        Swordfish*</p> <p>Mackerel (king)            Tilefish*</p> <p>Orange roughy*</p>	<p><b>EAT NO MORE THAN SIX 6-OZ. SERVINGS PER MONTH:</b></p> <p>Carp</p> <p>Cod*</p> <p>Crab (blue)</p> <p>Crab (Dungeness)</p> <p>Crab (snow)</p> <p>Mahi Mahi</p> <p>Monkfish*</p> <p>Perch (freshwater)</p> <p>Skate</p> <p>Snapper*</p> <p>Tuna (canned, chunk light)</p> <p>Tuna (fresh Pacific albacore)</p>	<p><b>ENJOY THESE FISH:</b></p> <p>Anchovies                      Oysters</p> <p>Butterfish                        Perch (saltwater)</p> <p>Calamari (squid)                Pollock</p> <p>Catfish                            Salmon#</p> <p>Caviar (farmed)                  Sardines</p> <p>Clams                                Scallops</p> <p>Crab (king)*                        Shad</p> <p>Crawfish/crayfish                Shrimp*</p> <p>Flounder*                         Sole</p> <p>Haddock*                         Sturgeon (farmed)</p> <p>Hake                                Tilapia</p> <p>Herring                             Trout (freshwater)</p> <p>Lobster (spiny/rock)              Whitefish</p>
<p><b>HIGH MERCURY</b></p> <p><b>EAT NO MORE THAN THREE 6-OZ. SERVINGS PER MONTH:</b></p> <p>Bass (saltwater)*</p> <p>Bluefish</p> <p>Croaker</p> <p>Halibut*</p> <p>Lobster (American/Maine)</p> <p>Sea trout</p> <p>Tuna (canned, white albacore)</p> <p>Tuna (fresh bluefin, ahi)</p>		<p>#Farmed salmon may contain PCBs, manufactured chemicals with serious long-term health effects. (PCBs were banned in the U.S. in the 1970s but remain in the environment.)</p>
<p>*** Fish in Trouble! These fish are perilously low in numbers or are caught using environmentally destructive methods.</p>		

- **Cálculo del mercurio ingerido al consumir pescado**

<http://www.nrdc.org/health/effects/mercury/espanol/protect.asp>

- **Referencia RSA con respecto al contenido de Hg**

<b>MERCURIO</b>	<b>Límite máximo (mg/kg de producto final)</b>
Pescado fresco, enfriado y congelado:	
talla pequeña	0,5
talla grande como tiburón y albacora	1,5

Fuente: RSA, 2006.

- **Recomendaciones de la EPA y FDA para el consumo de pescado**

Estas tres recomendaciones para el consumo de pescados o mariscos ayudan a mujeres y niños a recibir los beneficios de estos alimentos, confiando en que habrán reducido su exposición a los efectos dañinos del mercurio.

1. No consumir carne de peces depredadores (tiburón, pez espada, etc.) porque contienen altos niveles de mercurio.

2. Consumir hasta dos comidas promedio a la semana de diferentes pescados o mariscos que sean bajos en mercurio (atún enlatado claro, salmón, etc.).

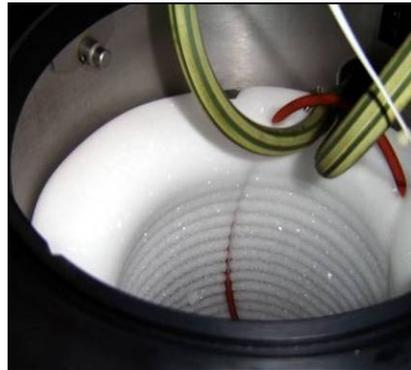
3. Consumir por semana una comida promedio de pescado capturado de forma artesanal, pero no consumir ningún otro tipo de pescado durante la semana.

## Anexo 6 - Preparación candidato a MRC Alfonsino

- **Primera molienda del Alfonsino**



- **Liofilizador**



- **Alfonsino liofilizado**



- **Mortero Planetario**



- **Alfonsino Tamizado**



- **Homogeneizador**



- **Enfrascado del material para cuantificación**



Al momento de tomar la fotografía, la botella de la derecha ya había sido irradiada. La irradiación produce el color ámbar del vidrio.

- **Cápsulas para AAN con polvo seco de Alfonsino**



## **Anexo 7 – Equipos utilizados en la elaboración del MRC**

- Balanza marca Mettler modelo Precisa Hispana SB 8001
- EAA LECO AMA 254 (Advanced Mercury Analyzer)
- EAA marca Milestone, modelo DMA 80.
- EAA marca Perkin Elmer 2380.
- Equipo molidor marca Moulinex
- Estufa marca Electric Company
- Freezer marca Fensa
- Homogenizador de pantalón
- Liofilizador marca Christ
- Molino de bola marca Retsch
- Molino planetario de alta velocidad marca Retsch
- Reactor nuclear RECH-1 para AAN.
- Shaker de tamices plásticos. Mallas de 250  $\mu\text{m}$  de nylon.
- Sistema generador de hidruros Perkin Elmer MHS-15.
- Termocuplas marca WRT

**Anexo 8 - Métodos utilizados por los laboratorios en la ronda de inter  
comparación**

Código	Método	Laboratorio
1	EAA con generador de vapor frío	Universidad Federico Santa María
2	EAA con generador de vapor frío	Centro de Estudios, Mediciones y Certificación de Calidad, Cesmec
3	EAA con generador de vapor frío	Instituto de Pesquisas Energéticas y Nucleares, IPEN. Sao Paulo, Brasil
4	EAA en equipo LECO AMA 254	Departamento de Geología del centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, CIEMAT. Madrid, España.
5	EAA en equipo Milestone, análisis 1	Departamento de Aplicaciones Nucleares, Sección de Metrología Química, Laboratorio de Activación Neutrónica de Sede La Reina, Comisión Chilena de Energía Nuclear.
6	EAA en equipo Milestone, análisis 2	Departamento de Aplicaciones Nucleares, Sección de Metrología Química, Laboratorio de Activación Neutrónica de Sede La Reina, Comisión Chilena de Energía Nuclear.
7	AAN	Departamento de Aplicaciones Nucleares, Sección de Metrología Química, Laboratorio de Activación Neutrónica de Sede La Reina, Comisión Chilena de Energía Nuclear.

### Anexo 9 - Determinación de la masa inicial de agua en la matriz Alfonsino

Placas	Masa Molido (g)	Masa Liofilizado (g)	Agua (g)	%Agua
1	200	43,6	156,4	78,2
2	200	44,4	155,6	77,8
3	200	45,2	154,8	77,4
4	200	44,9	155,1	77,55
5	200	44,1	155,9	77,95
6	200	44,3	155,7	77,85
7	200	44,3	155,7	77,85
8	200	44,6	155,4	77,7
9	187,8	43	144,8	77,10
10	198,8	45,6	153,2	77,06
11	228,6	55,4	173,2	75,77
12	238,2	65,6	172,6	72,47
13	227,7	56	171,7	75,41
14	227,3	63	164,3	72,28
15	242,2	59,1	183,1	75,59
16	231,1	55,3	175,8	76,07
17	220,4	51,7	168,7	76,54
18	175	39,2	135,8	77,6
19	221,4	52,9	168,5	76,11
20	219,8	52,2	167,6	76,25
21	191,5	44	147,5	77,02
22	174	39,8	134,2	77,13
23	205,8	46,2	159,6	77,55
24	193,9	45,1	148,8	76,74
25	200,7	47	153,7	76,58
26	228,7	56,9	171,8	75,12
27	182,4	42,7	139,7	76,59
28	197,5	44,8	152,7	77,32
29	221,5	51,1	170,4	76,93
30	234,9	56,1	178,8	76,12
31	169	36,9	132,1	78,17
32	181,7	40,6	141,1	77,66
33	214,6	48,7	165,9	77,31
34	198,2	45,2	153	77,19
35	176,9	40,6	136,3	77,05
36	164,1	38,6	125,5	76,46
37	220,6	51,2	169,4	76,79
38	195,9	43,9	152	77,59
39	171	38,8	132,2	77,31
40	198,3	45,5	152,8	77,05
41	207,5	46,8	160,7	77,45
42	175,7	40,3	135,4	77,06
43	185,5	41,6	143,9	77,57
44	213,4	50,1	163,3	76,52

45	196,5	45,3	151,2	76,95
46	211	51,4	159,6	75,64
47	206,8	47,3	159,5	77,12
48	182,1	42,1	140	76,88
49	183,8	34,5	149,3	81,23
50	211,5	49,3	162,2	76,69
51	211,1	49,9	161,2	76,36
52	189,9	44,6	145,3	76,51
53	200,9	46,1	154,8	77,05
54	201,8	47,2	154,6	76,61
55	211,8	42,9	168,9	79,75
56	234,3	52,7	181,6	77,51
57	206,3	45,1	161,2	78,14
58	238,3	53,1	185,2	77,72
59	205,7	46,2	159,5	77,54
60	229,4	51,9	177,5	77,38
61	230,7	50,9	179,8	77,94
62	215,4	49,3	166,1	77,11
63	191,3	44,1	147,2	76,95
64	230,6	52,6	178	77,19
65	209,8	58,5	151,3	72,12
66	202	44,6	157,4	77,92
67	243	55,1	187,9	77,33
68	235,4	51	184,4	78,33
69	216,2	48,7	167,5	77,47
70	246	54	192	78,05
71	230,2	52,3	177,9	77,28
72	230,2	52,2	178	77,32
73	228,2	51,6	176,6	77,39
74	214,4	54	160,4	74,8
75	183,3	41,1	142,2	77,58
76	205,3	46,8	158,5	77,20
77	207,9	48,7	159,2	76,58
78	181,9	42,3	139,6	76,75
79	186,5	42,9	143,6	76,99
80	185,2	43	142,2	76,78
81	231,2	57,4	173,8	75,17
82	214,8	50,7	164,1	76,39
83	208,3	50,4	157,9	75,80
84	213,6	51,5	162,1	75,89
85	220,5	52,8	167,7	76,05
86	190,4	42,4	148	77,73
87	178,6	39,3	139,3	77,99
88	189,5	41,9	147,6	77,89
89	218,9	50,5	168,4	76,93
90	184,3	43,4	140,9	76,45
91	165,5	38,5	127	76,74

92	181,5	41,9	139,6	76,91
93	201,6	46,9	154,7	76,74
94	184,6	41,9	142,7	77,30
95	195,2	45,9	149,3	76,49
96	172,9	39,6	133,3	77,09
97	181,9	32,5	149,4	82,13
98	179,1	41,2	137,9	76,99
99	204	46,3	157,7	77,30
100	192,6	43,7	148,9	77,31
101	171,2	39	132,2	77,22
102	180,7	36,6	144,1	79,75
103	207,7	48,1	159,6	76,84
104	182,2	37,4	144,8	79,47
<b>Σ</b>	21167,10	4870,00	16297,10	<b>77,03</b>
<b>s</b>				<b>1,33%</b>

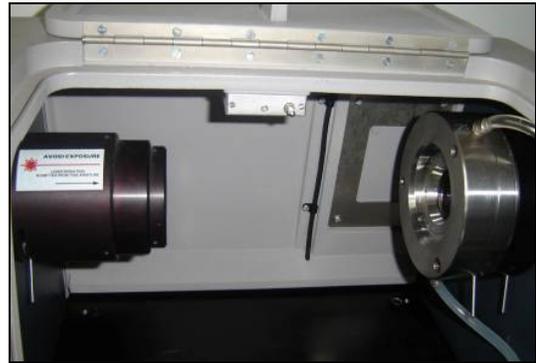
De la tabla anterior se obtiene que:

100 g de material húmedo → 77,03 g agua.

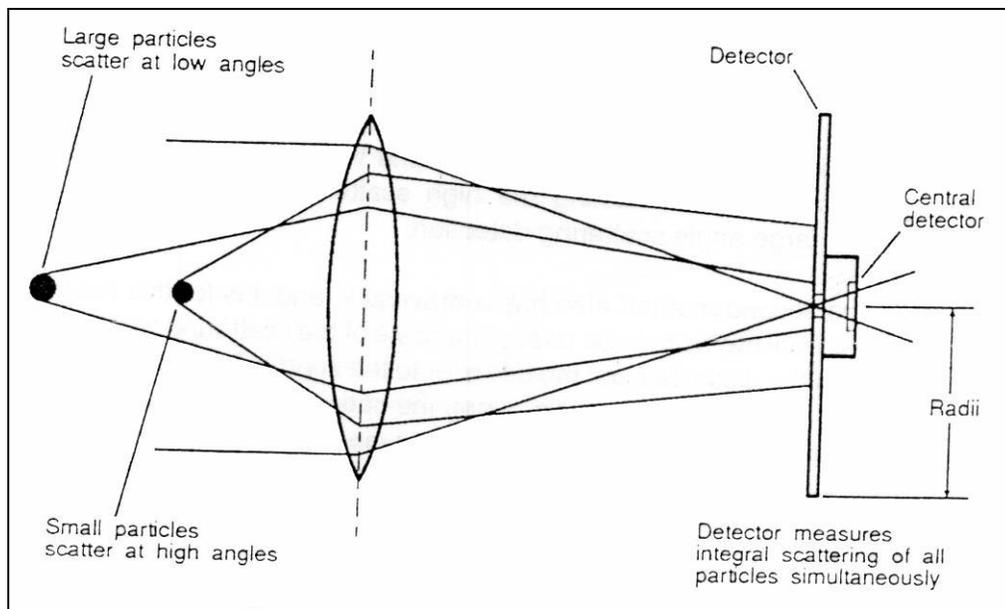
Por lo tanto,

1 g de muestra húmeda → 0,77 g de agua + 0,23 g de muestra sólida.

## Anexo 10 - Analizador de tamaños de partículas

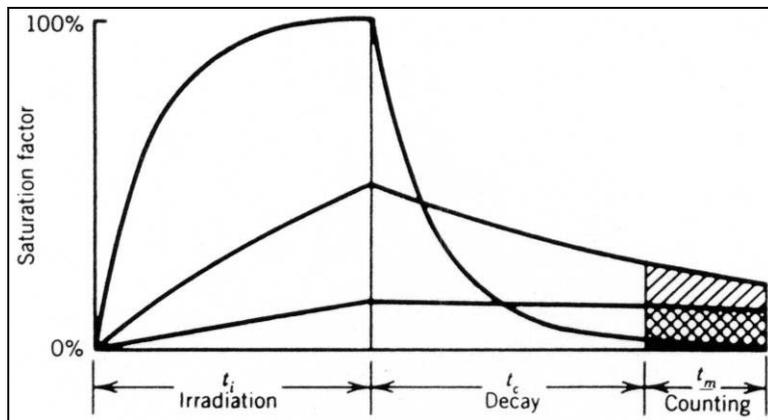


- **Propiedades de la luz difractada**





### Anexo 11 - Curvas de radioactividad inducida para AAN



Fuente: Drasch, 1994.

### Anexo 12 - MRCs utilizados como controles en la caracterización del material.

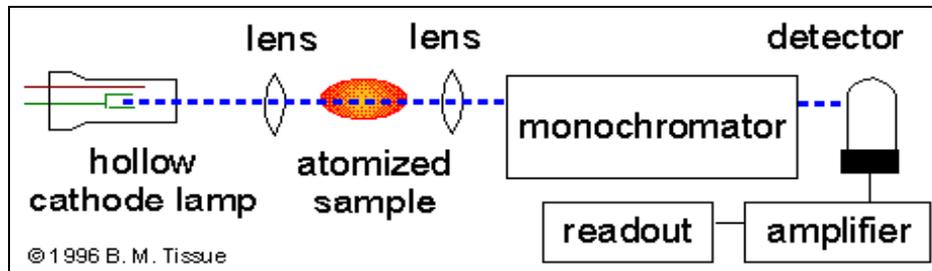
#### Determinación de la exactitud del método AAN

Material de Referencia certificado	Concentración Certificada de Hg total
NRC Dorm-2 Dogfish Muscle	4,64 ± 0,26 [mg/kg]
NRC Dolt-2 Dogfish Muscle	2,14 ± 0,26 [mg/kg]
Pig Kidney	1,97 ± 0,04 [mg/kg]
Tuna Fish 463	2,85 ± 0,16 [mg/kg]
Tuna Fish 464	5,24 ± 0,10 [mg/kg]

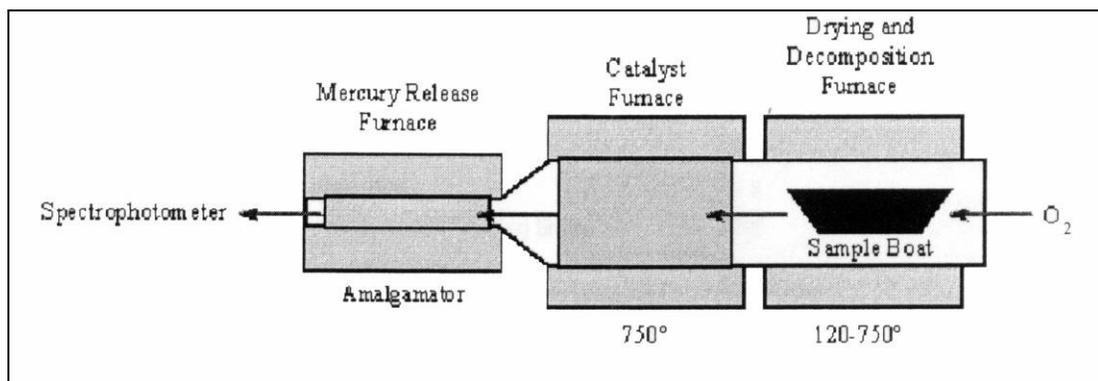
### Anexo 13 - Espectrofotómetro de Absorción Atómica



- **Funcionamiento EAA**



- **Funcionamiento EAA con amalgamación**





### Anexo 14 – Evaluación estadística. Determinación de homogeneidad

Unidad	Repl 1 (mg/kg)	Repl 2 (mg/kg)	Repl 3 (mg/kg)	Repl 4 (mg/kg)	Repl 5 (mg/kg)	Repl 6 (mg/kg)	Media
9	0,64160	0,64595	0,64649	0,63000	0,64160	0,64758	0,642
15	0,61172	0,61172	0,60086	0,61933	0,61933	0,61933	0,614
20	0,60792	0,61770	0,59923	0,61064	0,61390	0,60249	0,609
33	0,60357	0,60520	0,62530	0,59379	0,60303	0,59597	0,604
34	0,61390	0,62476	0,61172	0,61172	0,61770	0,61444	0,616
43	0,61553	0,61064	0,61824	0,59868	0,61118	0,62150	0,613
48	0,61933	0,62639	0,62422	0,61770	0,62096	0,61281	0,620
51	0,63454	0,65000	0,63780	0,63400	0,63563	0,63345	0,638
65	0,61172	0,61390	0,61770	0,60683	0,61716	0,60303	0,612
75	0,62422	0,62748	0,62204	0,62856	0,64000	0,62693	0,628
80	0,63617	0,64432	0,64052	0,63237	0,63943	0,64323	0,639
90	0,61879	0,61118	0,60303	0,60357	0,60194	0,61064	0,608
105	0,60357	0,61390	0,61553	0,61933	0,63454	0,61172	0,616
109	0,60086	0,59923	0,62530	0,61172	0,61824	0,62422	0,613
110	0,62096	0,63563	0,61716	0,62748	0,63943	0,60194	0,624

Frascos	Count	Average	Variance	Standard deviation	Minimum	Maximum	Range	
9	6	0,642204	0,0000421913	0,00649548	0,63	0,647579	0,0175785	
15	6	0,613715	0,0000535586	0,00731837	0,600857	0,619328	0,0184712	
20	6	0,608644	0,000048128	0,00693743	0,599227	0,617699	0,0184712	
33	6	0,604479	0,000124747	0,011169	0,593795	0,625304	0,0315097	
34	6	0,615707	0,0000245165	0,00495142	0,611723	0,624761	0,0130385	
43	6	0,612628	0,0000638296	0,00798934	0,598684	0,621502	0,0228174	
48	6	0,620234	0,000023336	0,00483073	0,612809	0,626391	0,0135818	
51	6	0,637569	0,0000394458	0,00628059	0,633453	0,65	0,0165465	
65	6	0,611723	0,0000338824	0,00582086	0,60303	0,617699	0,0146683	
75	6	0,628206	0,000039048	0,00624884	0,622045	0,64	0,0179552	
80	6	0,639339	0,0000200009	0,00447223	0,632367	0,644319	0,011952	
90	6	0,608191	0,0000428252	0,0065441	0,601944	0,618785	0,0168414	
105	6	0,616431	0,000106212	0,0103059	0,603574	0,63454	0,0309664	
109	6	0,613262	0,000128613	0,0113408	0,599227	0,625304	0,026077	
110	6	0,623765	0,000185517	0,0136205	0,601944	0,639429	0,0374857	
-----								
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b><math>\bar{(X)}</math></b>	<b>0,61974</b>	<b>0,000189958</b>	<b>0,0137825</b>	<b>0,593795</b>	<b>0,65</b>	<b>0,0562053</b>

### Variance Check

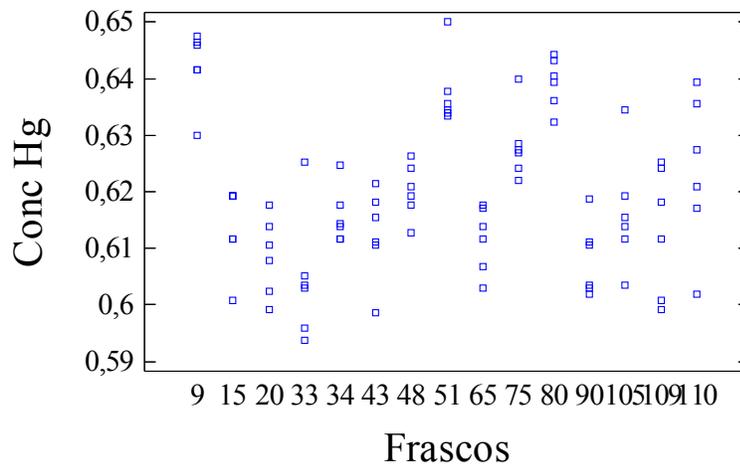
Cochran's C test: 0,190108	P-Value = 0,151142
Bartlett's test: 1,24935	P-Value = 0,339177
Hartley's test: 9,27545	

Como el valor del menor P-value es mayor o igual a 0,05, no existe diferencia significativa entre las desviaciones estándares en un nivel de confianza del 95,0%.

### Análisis de Varianza

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,012027	14	0,000859069	13,20	0,0000
Within groups	0,00487926	75	0,0000650568		
-----					
Total (Corr.)	0,0169062	89			

### Scatterplot by Level Code



### Anexo 15 - Análisis de varianza (ANOVA) de un factor

El análisis de varianza se puede definir como una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en dos componentes, cada uno de los cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total (Sepúlveda, 2000).

Con respecto al contenido elemental, para determinar la homogeneidad, en un material envasado en unidades utilizables es necesario analizar las mediciones entre las unidades y dentro de las unidades (Sepúlveda, 2000).

En la Tabla 2.4.1. se muestra una generalización de los datos para determinar las distintas variaciones en un material envasado en unidades utilizables, en donde se consideran  $h$  unidades del material, y de cada una se hacen  $n$  mediciones, donde  $x_{ij}$  es la medida  $j$  del frasco  $i$ . Las medias de las mediciones de cada frasco son  $X_1, X_2, \dots, X_h$  y la media de todos los valores agrupados juntos es  $X$ .

Tabla 2.4.1: Tabla general para realizar el análisis de varianza.

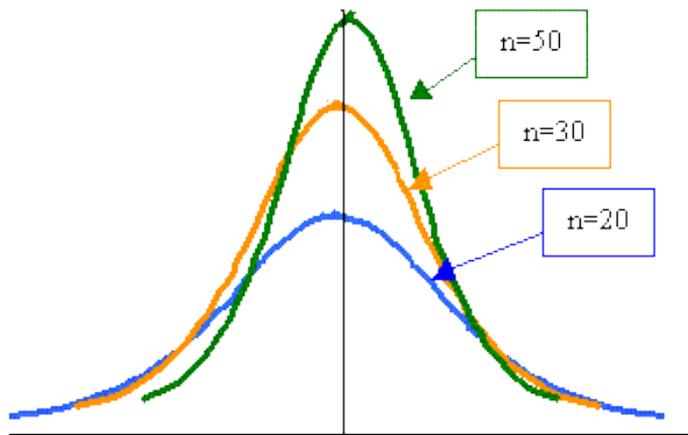
Unidades (frascos)	Mediciones					Media	
	1	2	.....	j	.....		n
$U_1$	$X_{11}$	$X_{12}$	.....	$X_{1j}$	.....	$X_{1n}$	$X_1$
$U_2$	$X_{21}$	$X_{22}$	.....	$X_{2j}$	.....	$X_{2n}$	$X_2$
$U_i$	$X_{i1}$	$X_{i2}$	.....	$X_{ij}$	.....	$X_{in}$	$X_i$
$U_h$	$X_{h1}$	$X_{h2}$	.....	$X_{hj}$	.....	$X_{hn}$	$X_h$
	Media total						$X$

La hipótesis nula adoptada es que todas las unidades son tomadas de una población con media  $\bar{x}$  y varianza  $\sigma^2$ . En base a esta hipótesis se puede estimar  $\sigma^2$  de dos formas: una estudia la variación dentro de cada unidad, y la otra, la variación entre las distintas unidades (Sepúlveda, 2000). Si la hipótesis nula es correcta, estas dos estimaciones de  $\sigma^2$  no deberían diferir en forma significativa.

## Anexo 16 - Teorema del límite central

Se seleccionan muestras aleatorias de  $n$  observaciones de una población de cualquier distribución con media  $\bar{x}$  y desviación estándar  $\sigma$ . Cuando  $n$  es grande, la distribución muestral de las medias tendrá aproximadamente una distribución normal con una media igual a  $\bar{x}$  y una desviación estándar de  $\sigma / \sqrt{n}$ .

La aproximación será cada vez más exacta a medida de que  $n$  sea cada vez mayor.



En condiciones ideales, se asume que un método analítico se encontrará bajo control estadístico cuando la distribución de sus resultados se aproxime a una distribución normal y no presente ningún error sistemático.

**Anexo 17 - Evaluaciones estadísticas. Ronda de inter comparación para  
determinación de fracción de masa de mercurio (mg/kg)**

Repl	AAN	Sta. Maria	Leco AMA 254	CESMEC	Milestone1	Milestone2	IPEN
1	0,64160	0,64100	0,61800	0,60000	0,63760	0,62000	0,60915
2	0,63000	0,64500	0,61100	0,62000	0,65600	0,62650	0,60450
3	0,61172	0,64700	0,61800	0,58000	0,65600	0,63220	0,62000
4	0,60520	0,64800	0,63700	0,60000	0,63490	0,63670	0,61600
5	0,59597	0,65400	0,64100	0,61000	0,63490	0,64890	0,60140
6	0,62476	0,65800	0,65200	0,64000	0,66770	0,65980	0,61225
7	0,61118	0,66000	0,65500	0,60500	0,67480	0,66590	0,62310
8	0,64432	0,66200	0,66000	0,62500	0,65710	0,62400	0,64600
9	0,60086	0,67100	0,62400	0,60000	0,65460	0,65000	0,61690
Media	0,62	0,65	0,64	0,61	0,65	0,64	0,65

Labs	Count	Average	Variance	Standard deviation	Minimum	Maximum	Range
AAN	9	0,618401	0,000308375	0,0175606	0,595968	0,644319	0,0483511
CESMEC	9	0,608889	0,000304861	0,0174603	0,58	0,64	0,06
IPEN	9	0,616589	0,000171312	0,0130886	0,6014	0,646	0,0446
Leco AMA	9	0,635111	0,000328611	0,0181276	0,611	0,66	0,049
Milestone1	9	0,652622	0,000202474	0,0142294	0,6349	0,6748	0,0399
Milestone2	9	0,640444	0,000268783	0,0163946	0,62	0,6659	0,0459
Sta. Maria	9	0,654	0,0000925	0,00961769	0,641	0,671	0,03
-----							
Total	63	<b>(X) 0,632294</b>	0,00049889	0,0223358	0,58	0,6748	0,0948

**Análisis de varianza:**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0175158	6	0,00291931	12,19	0,0000
Within groups	0,0134153	56	0,000239559		
-----					
Total (Corr.)	0,0309312	62			

Test de Rangos Múltiples para la Concentración vs Laboratorios:

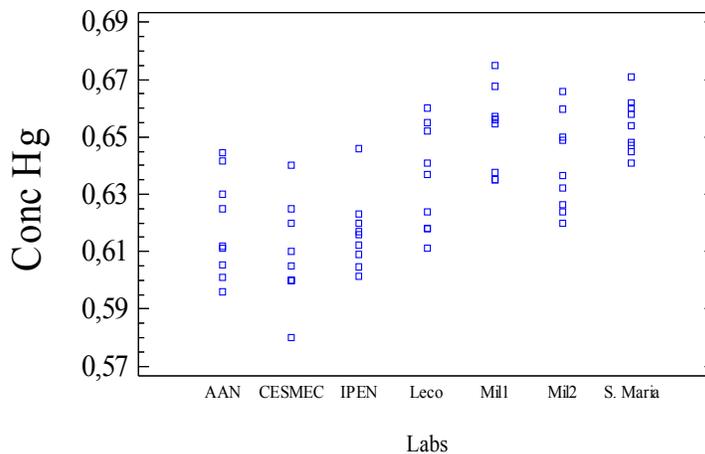
Method: 95,0 percent LSD			
Labs	Count	Mean	Homogeneous Groups
CESMEC	9	0,608889	X
IPEN	9	0,616589	X
AAN	9	0,618401	X
Leco AMA	9	0,635111	X
Milestone2	9	0,640444	XX
Milestone1	9	0,652622	X
Sta. Maria	9	0,654	X

Variance Check

Cochran's C test: 0,195962 P-Value = 1,0  
 Bartlett's test: 1,07871 P-Value = 0,669915  
 Hartley's test: 3,55255

Los tres ensayos mostrados en la tabla anterior prueban la hipótesis nula que la desviación estándar de la Conc Hg en cada uno de los 7 niveles de Labs es la misma. De particular interés son los valores P. Debido a que el menor valor P es mayor o igual que 0,05, no hay diferencias significativas entre las desviaciones estándares a un nivel de confianza del 95%.

Scatterplot by Level Code



### **Anexo 18 – Transformación de masas a base seca**

Según el Anexo 9, la masa inicial de agua de la matriz Alfonsino es de 77,03 g /100 g.

Esto significa que de 100 g de muestra, el 22,97 % es matriz seca.

Para la determinación de mercurio, utilizando el método EAA, la NCh. 2667 (2001) hace referencia que la cantidad de muestra necesaria para el análisis es de 5 g peso húmedo.

1 g peso húmedo → 0,23 g peso seco

5 g peso húmedo → x

x = 1,15 g ≈ 1 g peso seco necesarios para la medición.