

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE DE OCCIDENTE

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN
LABORATORISTA QUÍMICO

IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ESPECTROSCOPÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO PARA EL ANÁLISIS DE
ESTAÑO EN ATUNES Y SARDINAS ENLATADAS

LAURA BADILLA LOBO

2020

Resumen

Badilla, L. (2020). *Implementación de la metodología de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para el análisis de estaño en atunes y sardinas enlatadas* [Universidad de Costa Rica].

Director: M. Sc. Yajaira Salazar Chacón

Palabras clave: estaño, atún y sardinas enlatadas, parámetros de desempeño.

El estaño es un metal pesado que puede causar efectos en la salud como: vómito, diarrea, problemas hepáticos y cerebrales, entre otros. Se utiliza en la hojalata empleada para el enlatado de alimentos y bebidas, por ejemplo, atunes y sardinas. La presente investigación consistió en la implementación de la metodología de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para la determinación de estaño en atún y sardina enlatadas, para lo cual se utilizó la digestión ácida con horno microondas para la mineralización de las muestras. La evaluación de los siguientes parámetros del desempeño: linealidad y ámbito de trabajo; efecto matriz, exactitud: precisión (instrumental e intermedia) y veracidad; límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, selectividad, especificidad y estimación de incertidumbre; permitió determinar que dicha metodología es apta para la determinación de estaño en atún enlatado, al cumplir con los criterios establecidos por la normativa de la Unión Europea y el CODEX. Además, se estableció que la metodología no puede ser utilizada para la evaluación de la conformidad de estaño en sardinas enlatadas, debido a que no se cumplieron algunos de los criterios de aceptación evaluados a niveles cercanos al límite máximo permitido de 200 mg/kg. Al analizar muestras de atún en agua, atún en aceite, sardina en aceite y sardina en salsa de tomate de interés comercial; se obtuvieron concentraciones de estaño menores a 0.6 mg/kg, que corresponde al límite de detección establecido, por lo que los resultados se reportaron como no detectados.

Contenido

1. Introducción.....	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Justificación	3
1.3 Antecedentes	6
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
2. Marco teórico.....	9
2.1 Generalidades de los metales pesados	9
2.2 Generalidades del estaño	10
2.2.1 Efectos del estaño en la salud	11
2.3 Legislación	12
2.3.1 Reglamentación internacional.....	12
2.3.2 Reglamentación nacional.....	12
2.4 Generalidades del pescado	12
2.5 Comercio del atún y la sardina en conserva	13
2.6 Metodología analítica para la determinación de estaño	14
2.6.1 Espectroscopía de absorción atómica	14
2.6.1.1 Espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito.....	16
2.6.1.2 Interferencias.....	18
3. Marco metodológico	19
3.1 Optimización de las condiciones instrumentales para la determinación de Sn.....	19
3.1.1 Optimización de las condiciones del equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.....	19
3.1.2 Optimización del proceso de digestión de la muestra.....	21
3.2 Determinación de los parámetros de desempeño del método para la determinación de Sn en atún y sardina enlatada	22
3.2.1 Linealidad y ámbito de trabajo.....	23
3.2.2 Efecto matriz.....	23
3.2.3 Veracidad.....	24

3.2.4	Precisión.....	25
3.2.4.1	Precisión instrumental.....	25
3.2.4.2	Precisión intermedia o reproducibilidad.....	25
3.2.5	Límite de detección (LD).....	26
3.2.6	Límite de cuantificación (LC).....	26
3.2.7	Sensibilidad.....	27
3.2.8	Selectividad.....	27
3.2.9	Especificidad.....	27
3.2.10	Robustez.....	27
3.2.11	Estimación de la incertidumbre.....	28
3.3	Evaluación del método con muestras reales de sardina y atún enlatado	28
3.3.1	Definición de la muestra.....	28
3.3.2	Muestreo.....	29
3.3.3	Recepción de la muestra.....	29
3.3.4	Procesamiento y almacenamiento de la muestra.....	29
3.3.5	Determinación de Sn.....	29
4.	Resultados y discusión.....	30
4.1	Optimización condiciones instrumentales para determinación de estaño	30
4.1.1	Equipo de medición espectrómetro de absorción atómica.....	30
4.1.2	Digestión de la muestra.....	32
4.2	Resultados de la determinación de los parámetros de desempeño del método para la determinación de estaño.....	34
4.2.1	Linealidad.....	34
4.2.2	Efecto matriz.....	35
4.2.3	Veracidad.....	37
4.2.4	Precisión.....	38
4.2.4.1	Precisión instrumental.....	38
4.2.4.2	Precisión intermedia o reproducibilidad.....	39

4.2.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	41
4.2.6 Sensibilidad	43
4.2.7 Especificidad.....	44
4.2.8 Selectividad	45
4.2.9 Incertidumbre.....	46
4.3 Resultados de análisis de estaño en muestras de interés comercial	47
5. Conclusiones.....	50
6. Recomendaciones.....	51
7. Referencias	52
8. Anexos.....	57

Índice de cuadros

Cuadro 1. Condiciones instrumentales recomendadas para la determinación de Sn por el software SpectrAA versión 5.4 PRO del equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito. Las etapas del programa corresponden a las variaciones en la temperatura durante el periodo en el que se realiza la determinación del Sn.....	20
Cuadro 2. Concentración de los patrones de la curva de calibración utilizada en la determinación de Sn mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.....	21
Cuadro 3. Programa para la digestión de muestras de producto pesquero enlatado para el análisis de Sn en digestor microondas.....	21
Cuadro 4. Datos para la preparación de muestras fortificadas a diferentes niveles de fortificación para la evaluación de la veracidad y la precisión intermedia.....	24
Cuadro 5. Criterios de linealidad para curvas de calibración de Sn preparadas en HNO ₃ 2 % y en extracto de cada una de las matrices de estudio.....	31
Cuadro 6. Porcentajes de recuperación promedio obtenidos al cuantificar el Sn en muestras de cada una de las matrices en estudio, empleando una curva de calibración de Sn preparada en HNO ₃ 2 %, mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.....	33
Cuadro 7. Porcentajes de recuperación promedio de Sn obtenidos al analizar muestras de las matrices de estudio en curvas de calibración preparadas en extracto de matriz, mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.....	33
Cuadro 8. Comparación de los coeficientes de determinación promedio de las curvas de calibración de Sn preparadas en HNO ₃ 2 % y en extracto de las matrices de estudio con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA.....	35
Cuadro 9. Porcentajes de recuperación promedio de Sn obtenidos al analizar mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito, muestras fortificadas de las diferentes matrices en estudio sobre curvas de calibración preparadas en HNO ₃ 2 % y en extracto de dichas matrices; y su comparación	

con respecto a la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea y el Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX	36
Cuadro 10. Resultados obtenidos al evaluar los porcentajes de recuperación promedio de Sn a diferentes niveles de concentración, con respecto a los criterios de aceptación establecidos.....	37
Cuadro 11. Coeficiente de variación para la evaluación de la precisión instrumental por el método de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito y comparación con el criterio de aceptación.....	39
Cuadro 12. Resultados obtenidos al realizar la evaluación del cumplimiento del criterio de aceptación establecido para la determinación de la precisión intermedia o reproducibilidad del método de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para la determinación de Sn	40
Cuadro 13. Límite de detección y límite de cuantificación y evaluación del cumplimiento del criterio de aceptación	41
Cuadro 14. Pendientes de la ecuación promedio de 6 curvas de calibración de Sn preparadas en HNO ₃ 2 % y 6 preparadas en extracto de cada una de las matrices de estudio	43
Cuadro 15. Agrupación obtenida al aplicar la prueba de Tukey del análisis ANOVA utilizando el programa estadístico Minitab versión 18, a un 95 % de confianza, de las pendientes promedio de 6 curvas de calibración preparadas en HNO ₃ 2 % y 6 en extracto de cada una de las matrices en estudio.....	43
Cuadro 16. Determinación de la incertidumbre según los niveles de concentración de Sn sobre matriz	46
Cuadro 17. Resultados de muestras de interés comercial analizadas para la determinación de Sn	48

Índice de figuras

Figura 1. Curvas de calibración de Sn preparadas en HNO ₃ 2 %, extracto de atún en agua (At-Ag), de atún en aceite (At-Ac), de sardina en aceite (S-Ac) y de sardina en salsa de tomate (S-Tom)	31
Figura 2. Comportamiento de la absorción durante el tiempo en que se realiza la cuantificación del Sn.....	44
Figura 3. Señal producida por el equipo de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, en UA al analizar muestras con diferente concentración de Sn.....	45

1. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

El consumo de alimentos no inocuos puede estar asociado con riesgos crónicos o agudos producto de la presencia de patógenos microbianos, residuos de medicamentos, contaminantes químicos o físicos y biotoxinas, que pueden afectar la salud de los consumidores, de ahí la importancia de garantizar el acceso a alimentos inocuos (Arispe & Tapia, 2007).

Al darse la apertura de los mercados y el aumento en el intercambio de productos alimenticios entre países, el aseguramiento de la inocuidad alimentaria pasó de ser un asunto de salud pública, a nivel de cada país, a ser un requisito de acceso a los mercados internacionales, por lo que se ha convertido en un aspecto contemplado en los acuerdos de la Organización Mundial del Comercio (Tafur, 2009).

Existen agencias especializadas y programas orientados a la protección de la salud de los consumidores y a promover prácticas leales en el comercio alimentario, por ejemplo, el Codex Alimentarius, el cual es un conjunto de normas, directrices y códigos de prácticas internacionales aprobados por la Comisión del Codex Alimentarius (FAO-WHO, 2020), la cual, a su vez, fue creada en 1961, por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de su programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias; cabe destacar que Costa Rica forma parte de este programa desde 1970. En la misma línea fue creada la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), mediante el Reglamento (CE) N°178/2002, con el fin de dar asesoría técnica y científica en la evaluación de riesgos de alimentos y piensos con el objetivo de proteger a los consumidores (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2002). Por su parte, en Estados Unidos, agencias federales, como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés), se encargan de la coordinación de programas de inocuidad de alimentos (Tafur, 2009).

Como parte de las medidas tomadas por Costa Rica en materia de inocuidad alimentaria, en el 2006, se decretó la Ley General del Servicio Nacional de Salud Animal N° 8495, la cual, en el artículo 6, inciso j, establece que el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), servicio adscrito al Ministerio de Agricultura y Ganadería, es el responsable de controlar y garantizar la inocuidad de los productos, subproductos y derivados de origen animal, para consumo humano y animal (Asamblea Legislativa de Costa Rica, 2006).

Considerando que SENASA es la autoridad competente en materia de monitoreo de residuos químicos, contaminantes y microorganismos en los productos y subproductos de la pesca y acuicultura, en el 2008, se promulgó el RTCR 409:2008 Reglamento de Límites Máximos Microbiológicos y de Residuos de Medicamentos y Contaminantes para los Productos y Subproductos de la Pesca y de la Acuicultura Destinados al Consumo Humano (2008), en el cual, como su nombre lo señala, se establecen los límites máximos permitidos (LMP) de ciertas sustancias químicas y contaminantes microbiológicos para este tipo de alimentos, con el propósito de garantizar su inocuidad y con ello, cumplir los requisitos del mercado internacional, principalmente el europeo.

Más recientemente, se estableció la Política Nacional de Inocuidad de los Alimentos N° 35960-S-MAG-MEIC-COMEX del 3 de mayo del 2010, con el fin de definir y establecer los lineamientos generales en materia de inocuidad de los alimentos producidos, elaborados, de consumo local, de importación y de exportación, para asegurar la protección de la salud y los derechos de los consumidores; en la misma se menciona al SENASA como parte de las dependencias competentes de su aplicación (MAG-MEIC-COMEX, 2010).

La responsabilidad del SENASA, en materia de inocuidad de alimentos, ha sido ampliamente establecida y entre sus funciones está el monitoreo de contaminantes en los alimentos de origen animal, los cuales se pueden definir como cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento como resultado del proceso de producción, elaboración, envasado, transporte, almacenamiento y otras etapas (Codex Alimentarius, 1995). Entre los

contaminantes que deben ser monitoreados se encuentran los metales pesados, a saber, cadmio, plomo y mercurio; estos se originan mayoritariamente por actividades geológicas naturales o producto de actividades antropogénicas como la industria minera y no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica, ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino *et al.*, 2002).

Los productos enlatados utilizan hojalatas que, por lo general, contienen estaño para evitar su corrosión, por lo que se deben establecer programas para el monitoreo de este metal pesado de forma que se asegure que los productos no lo presentan en concentraciones superiores al límite máximo normado (Gil *et al.*, 2005; Tarley *et al.*, 2001). Sus efectos en la salud pueden ir desde dolores estomacales, vómito y mareos, hasta daños hepáticos, cromosómicos y cerebrales, entre otros (Ministerio de Agricultura y Pesca, 2007). Por su parte, la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos señala que la ingesta excesiva de estaño puede causar irritaciones gastrointestinales, diarrea, vómitos, náuseas, anemia, problemas hepáticos y renales, e irritación de la piel y los ojos (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2005), de ahí la importancia de controlar su presencia en los alimentos.

1.2 Justificación

El Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), es el laboratorio oficial del SENASA, de acuerdo con el artículo 46 de la Ley SENASA N° 8495 (Asamblea Legislativa de Costa Rica, 2006). Este participa en la protección de la salud humana en Costa Rica, al garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos de origen animal. El LANASEVE tiene la responsabilidad de realizar el análisis de contaminantes, residuos de medicamentos, aditivos y plaguicidas en productos de origen animal para consumo humano, y como lo establece el artículo 47 de dicha Ley, los resultados de análisis emitidos por el mismo constituyen plena prueba, de

conformidad con las leyes pertinentes (Asamblea Legislativa de Costa Rica, 2006).

Sin embargo, el LANASEVE no cuenta con una metodología para la determinación de Sn en alimentos enlatados, razón por la cual las muestras deben ser enviadas a un laboratorio oficializado (autorizado) en Alemania, para el análisis respectivo, lo que implica costos más elevados para los clientes, por tanto, se deben cubrir los gastos de logística, adicionales al costo del análisis. Actualmente, la institución realiza la determinación de Hg, Cd y Pb, por lo que se considera viable y pertinente el desarrollo de una metodología para la determinación de Sn. Lo anterior se ve favorecido dado que el Laboratorio cuenta con los equipos y los insumos requeridos para el análisis de este metal, así también, el personal entrenado en la determinación de Cd y Pb de manera rutinaria, misma requerida para el análisis de Sn.

La técnica analítica empleada, actualmente en el LANASEVE, para el análisis de Cd y Pb, es la espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito, la cual es ampliamente utilizada en la determinación de metales pesados, por lo que se puede emplear también para el análisis de estaño. Su uso se asocia con la rapidez, la facilidad, la fiabilidad y la economía (Pérez & Barrantes, 2017; Walton & Reyes, 1983). Además, esta técnica es lo suficientemente sensible para alcanzar los niveles máximos establecidos en el RTCR 409:2008 para estos metales, al igual que para el Sn, el cual corresponde a 200 mg/kg para atún y sardina, ambos para producto enlatado (Gallegos, W.; Vega, M.; Noriega, 2012; Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2008; Razmilic, 1989). Adicionalmente, permite el cumplimiento de normativa técnica relativa a los parámetros de desempeño para la determinación de estaño como el Reglamento N° 333/2007 de la Comisión de las Comunidades Europeas (2007).

Cabe destacar que la problemática del estaño se puede presentar en cualquier alimento que se almacene en envase enlatado, pero la acción del SENASA se orienta a alimentos de origen animal. Según el Estudio de mercado pescados, moluscos y crustáceos en conserva en Costa Rica (Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, 2016), las carnes más consumidas son las

de res, pollo y cerdo, no obstante; se ha incrementado la demanda de pescados, moluscos y crustáceos enlatados, debido a la necesidad de contar con una alternativa práctica de comidas preparadas, listas para servir y de alto contenido proteico. De estas alternativas, el atún y la sardina son los productos que tienen mayor movimiento en el mercado por su amplia oferta y alto valor nutricional (Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, 2016), por esto y por la necesidad de cumplir con los requerimientos de mercados como el europeo para productos que se exportan a esta región, se eligieron dichas matrices para esta investigación.

Se estima que, en Costa Rica, anualmente, se procesan alrededor de 12 000 toneladas de atún, con un rendimiento aproximado del 50 %, es decir, se producen cerca de 6 000 toneladas de producto enlatado terminado, de las cuales entre 4 500 y 5 000 toneladas son consumidas a nivel nacional y las restantes son exportadas a diferentes países (DIPOA, 2020). Adicionalmente, según datos aportados por el Departamento de Cuarentena Animal del SENASA (Lobaina, 2020), en el 2018, se importaron cerca de 10 300 toneladas de atún enlatado y 1500 toneladas de sardina enlatada, ambos en diferentes presentaciones.

Debido a los argumentos expuestos, con el fin de evaluar la inocuidad de las sardinas y atunes enlatados de importancia comercial y de esta forma, demostrar el cumplimiento de la normativa nacional e internacional, se ha planteado como objetivo la implementación de un método de análisis aplicando la técnica de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para determinar el contenido de estaño en atún enlatado, en agua y en aceite; y sardina enlatada, en aceite y salsa de tomate, tanto en producto de consumo nacional como de exportación.

1.3 Antecedentes

La determinación de la concentración de estaño en alimentos mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito, específicamente en atún y sardina enlatados, no se ha realizado en un laboratorio oficial de Costa Rica, que analice productos de origen pesquero para consumo humano, en contraste con otros metales pesados, por ejemplo, el cadmio, el plomo y el mercurio; tampoco se han encontrado estudios relacionados con el tema, solo se cuenta con un estudio en el país, dirigido a la determinación de estaño en muestras de agua. En otros países, se han realizado estudios en los que se ha determinado la concentración de estaño en productos pesqueros enlatados empleando otras metodologías de análisis; además, se ha estudiado la concentración de este metal en otras matrices. A continuación, se detallan algunas de las investigaciones relacionadas a este metal.

En el 2001, Tarley, Coltro, Matsushita y De Souza presentaron una investigación en la cual se determinó la concentración de algunos metales pesados, incluido el estaño, en alimentos enlatados de diferentes marcas comercializadas en Brasil. Entre estos se encontraban productos como sardina enlatada en aceite de soya y en salsa de tomate. La determinación de los metales pesados se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica con llama y los resultados obtenidos muestran concentraciones mayores de estaño en las sardinas en salsa de tomate en comparación con las sardinas en aceite de oliva, sin embargo, todos los productos se encuentran por debajo del límite regulatorio brasileño de 250 $\mu\text{g/g}$ (Tarley et al., 2001).

Mol (2011) presentó un estudio en Turquía en el que determinó la concentración de algunos metales pesados en muestras de bonito, sardina y macarela enlatados, mediante la técnica de espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El estudio concluyó que las concentraciones de estaño eran inferiores a los 250 mg/kg, límite permisible establecido en dicho país (Mol, 2011).

El equipo de investigación integrado por Hosseini, Aflaki, Sobhanardakani, Tayebi, Babakhani y Regenstein (2013), realizó la determinación de estaño en productos enlatados producidos y vendidos en

Irán, por medio de espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente. La evaluación del estaño en diferentes marcas de pescado enlatado mostró que la concentración promedio en todas las especies, fue significativamente menor al límite máximo establecido por dicho país de 250 $\mu\text{g/g}$ (Hosseini et al., 2013).

Asimismo, Pérez, Jiménez, Tapia y Castañeda (2016) realizaron un análisis comparativo de los métodos de espectrofotometría de absorción atómica por llama y por gravimetría para la determinación de estaño y plomo, en esmalte base utilizado en la elaboración de cerámica de Talavera de Puebla, México, con el fin de evaluar el cumplimiento de lo establecido en la normativa mexicana en lo referente a la toxicidad de las piezas que se elaboran. En el estudio, se determinó que en el análisis de estaño hay diferencia entre los métodos en cuanto a selectividad. Para el método de absorción atómica se comprobó que la selectividad es aceptable según el criterio de aceptación en un ámbito entre el 85 % y el 115 %. Con el método gravimétrico, los resultados fueron no satisfactorios debido a que las impurezas en las muestras interfirieron con la determinación del estaño (Pérez, Jiménez, Tapia, & Castañeda, 2016).

En Costa Rica, los estudios relacionados con la determinación de estaño son limitados y, en el campo específico de los alimentos a la fecha, no hay estudios publicados. Sin embargo, es importante mencionar el trabajo de Espinoza y Alvarado (2012), quienes desarrollaron un método voltamperométrico para determinar estaño total en agua, debido a la preocupación causada por el amplio uso de compuestos de estaño en actividades antropogénicas. En la metodología se definió el límite de detección en 0,03 $\mu\text{g/L}$ y el de cuantificación en 0,1 $\mu\text{g/L}$, con un ámbito lineal comprendido entre (0,1 y 20) $\mu\text{g/L}$. Además, se concluyó que el método fue adecuado para realizar determinaciones de estaño en agua dulce con concentraciones cercanas a 1 $\mu\text{g/L}$, valor esperado para aguas no contaminadas.

1.4 Objetivos

Considerando la falta de información con respecto a la concentración de estaño en alimentos enlatados, específicamente sardinas y atunes enlatados, se plantearon los siguientes objetivos para la presente investigación.

1.4.1 Objetivo general

Implementar la metodología para la determinación de estaño en sardinas y atunes enlatados producidos y comercializados en Costa Rica empleando la técnica de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito.

1.4.2 Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones analíticas instrumentales y el proceso de digestión de las muestras de atún y sardina para la determinación de estaño.
- Determinar los parámetros de desempeño del método para la determinación de estaño en sardinas y atunes enlatados.
- Analizar muestras de sardina y atún enlatado de interés comercial para la determinación de estaño por espectroscopia de absorción atómica por horno de grafito.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de los metales pesados

El término “metal pesado” puede ser definido de varias formas, una de ellas lo define como un elemento metálico con peso atómico mayor a 40,04 (Azeh Engwa et al., 2019; Morais et al., 2012); también puede ser definido como un elemento con una densidad mayor a 5 g/cm³ (Azeh Engwa et al., 2019; Tchounwou et al., 2012) y es un nombre genérico utilizado para nombrar elementos asociados con contaminación y toxicidad (Duffus, 2002; Tchounwou et al., 2012).

En su mayoría, los metales pesados se encuentran como componentes naturales de la corteza terrestre pero, adicionalmente, procesos antropogénicos como aplicaciones en minería, pintura, galvanizado, entre otras; han potenciado la presencia de estos (Rodríguez-Heredia, 2017). Los metales no pueden ser degradados mediante procesos químicos ni antropogénicos, por lo cual una vez que ingresan en el medio ambiente se distribuyen en los diferentes entornos aire, agua o suelo; o se incorporan a los seres vivos (Reyes et al., 2016; Vullo, 2003).

Algunos metales pesados como por ejemplo: el cobalto (Co), el cromo (Cr), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el níquel (Ni), el hierro (Fe) y el zinc (Zn); son requeridos por algunos seres vivos como las plantas para cumplir con sus ciclos vitales (García & Dorronsoro, 2005). Sin embargo, por otra parte, existen elementos como mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb) y estaño (Sn), que no poseen una función esencial en los organismos vivos y adicionalmente, son tóxicos aun a bajas concentraciones al ser ingeridos por un período prolongado (Hosseini et al., 2013).

Las actividades geológicas naturales, como la acción de los volcanes, y actividades antropogénicas como la industria minera, que está catalogada como una de las actividades industriales más generadoras de metales pesados, constituyen una fuente importante de metales pesados en el suelo (Pineda, 2004). Además, los suelos reciben un aporte directo cuando se utilizan

fertilizantes y plaguicidas para aumentar la productividad de los cultivos (Ramos, 2002).

La presencia de los metales pesados y de compuestos orgánicos complejos en los recursos hídricos y en el medio ambiente, son responsables de innumerables situaciones de impacto sobre la salud pública en general (Thomann, 1984). Según el tipo de metal o metaloide, se producen afecciones que van desde daños en órganos vitales hasta desarrollos cancerígenos (Combariza, 2009; Nava-Ruiz & Méndez-Armenta, 2011).

En general, la presencia de metales pesados en el ambiente y en los alimentos puede desencadenar diversas intoxicaciones, las cuales causan daños irreparables en la salud humana y animal, tan graves como efectos teratogénicos, cáncer e incluso, la muerte. Las manifestaciones clínicas de toxicidad pueden variar, pero en muchos casos son producto del acoplamiento de los metales a enzimas, como sustitución de otros elementos originalmente requeridos (reacciones bioquímicas) (Nava-Ruiz & Méndez-Armenta, 2011).

2.2 Generalidades del estaño

El estaño es un metal pesado de una densidad de $7,3 \text{ g/cm}^3$, de color gris plateado, cuyo punto de fusión es de $231,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (Dominguez & Ferrer, 2011). Es maleable, resistente a los ácidos y las influencias atmosféricas, por lo que se utiliza para recubrir otros metales para evitar su oxidación, como por ejemplo en la hojalata, que es una lámina de acero o hierro que se recubre con estaño para ser utilizada en la industria de enlatados de alimentos, bebidas y aerosoles (Nordberg, 2013). Es buen conductor eléctrico a temperatura ambiente, sin embargo, esta propiedad disminuye a temperaturas más altas (Claramunt et al., 2013).

El estaño es ampliamente utilizado por su capacidad de formar aleaciones con otros metales, lo que permite un gran número de aplicaciones; la soldadura blanda, que consiste en una mezcla de estaño y plomo, se utiliza en fontanería, industria eléctrica y automovilística. Un ejemplo de un compuesto inorgánico de estaño es el cloruro de estaño, se encuentra en

colorantes y perfumes empleados en jabones, en algunos tipos de cerámica para producir resistencia a la abrasión, entre otras aplicaciones (Nordberg, 2013).

El estaño también se puede combinar con carbono para formar compuestos orgánicos de estaño, los cuales se usan para fabricar fungicidas, desinfectantes, estabilizadores para disminuir los efectos del calor y la luz en plásticos de PVC, entre otros (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2005; Manahan, 2007).

2.2.1 Efectos del estaño en la salud

El estaño metálico es poco absorbido en el tracto gastrointestinal, lo que lo hace poco tóxico. En el caso de los compuestos inorgánicos de estaño, la ingesta de grandes cantidades puede producir dolores de estómago, anemia y alteraciones hepáticas y renales (Comité sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, CODEX, 2003; Departamento de Salud y Servicios Humanos, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2005).

En el caso de los compuestos orgánicos de estaño, los efectos pueden variar, dependiendo del tipo de compuesto y del organismo que esté expuesto a él (Ministerio de Agricultura y Pesca, 2007). Este tipo de compuestos al ser respirados o ingeridos puede causar alteraciones a nivel del sistema nervioso (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2005). La sustancia más peligrosa es el estaño trietilico, que tiene enlaces de hidrógeno relativamente cortos y que se puede absorber a través de la comida, la respiración o el contacto con la piel, teniendo efectos agudos como irritaciones de ojos y piel, dolores de cabeza y de estómago, mareos, vómitos y falta de aliento. Ante una exposición prologada puede causar problemas psicológicos como depresión, daños hepáticos, disfunción del sistema inmune, daños cromosómicos, disminución en la producción de glóbulos rojos y, en algunos casos, grave daño cerebral que generan ira, trastorno del sueño, olvido y dolor de cabeza (Ministerio de Agricultura y Pesca, 2007; Nordberg, 2013).

2.3 Legislación

2.3.1 Reglamentación internacional

El Reglamento de la Comisión Económica Europea (CE) N° 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006, fija en 200 mg/kg el contenido máximo de estaño inorgánico en alimentos enlatados diferentes de las bebidas (La Comisión de las Comunidades Europeas, 2006).

Por su parte, CODEX establece en la Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos (CODEX STAN 193-1995), el límite máximo de 250 mg/kg de estaño inorgánico en alimentos enlatados diferentes de las bebidas (Codex Alimentarius, 1995).

2.3.2 Reglamentación nacional

En Costa Rica, el límite máximo permitido de estaño en productos enlatados es de 200 mg/kg, según lo establece el Reglamento RTCR 409:2008, del Ministerio de Agricultura y Ganadería (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2008).

2.4 Generalidades del pescado

Los peces se componen principalmente de agua, grasas y proteínas, las cuales son ricas en aminoácidos esenciales y son de fácil digestión (F. Pérez & Zamora, 2002).

Según lo mencionan Serra y Aranceta (2006) y Mazorriaga, Doménech y Mayordomo (2016), los pescados según su contenido graso se pueden clasificar de la siguiente forma:

- **Pescado azul o graso:** son peces migratorios, tienen carne oscura, tersa y con un porcentaje de grasa que oscila entre (5 a 10) %. Entre ellos se encuentran las anguilas, las sardinas, los atunes, los bonitos, entre otros.

- Pescado semigraso: tienen una proporción de grasa entre (2 a 5) %, aunque puede variar según la temporada, la madurez del pez y si ya han realizado el desove, porque requieren mayor porcentaje de grasa para el mismo. Entre ellos se encuentran el mero y el salmonete.
- Pescado blanco o magro: contienen menos de 2 % de grasa, son recomendados en dietas bajas en calorías. Entre ellos se encuentran la merluza, el rape y el bacalao.

El pescado aporta una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el conocido omega 3, el cual tiene la capacidad de disminuir el colesterol en la sangre, así como impedir la formación de trombos; gracias a estos atributos se recomienda en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (F. Pérez & Zamora, 2002; Serra & Aranceta, 2006).

Los pescados poseen alto contenido de yodo, fósforo, sodio y potasio y en el caso particular de los pescados azules, son ricos en vitaminas A y D. En sardinas, atunes, almejas y mejillones es elevado el aporte de hierro; aquellos que se consumen con espinas, aportan una alta cantidad de calcio como la sardina (Vázquez et al., 2005).

2.5 Comercio del atún y la sardina en conserva

En el mercado se encuentra una gran cantidad de productos en conserva, el atún y la sardina enlatada son de los preferidos debido a la amplia oferta de marcas y presentaciones y su elevado valor nutricional (Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, 2016).

La empresa nacional, Alimentos Pro Salud distribuye en el mercado de Costa Rica ocho marcas diferentes, entre las que se incluyen Sardimar, Tesoro del Mar, Soplas y Pacífico Azul, con las que logran captar el 70 % del mercado de atún enlatado. Por su parte, la empresa Calvo de origen español participa con un 16 % del consumo con productos como Calvo o Gomes da Costa (Corrales, 2016; Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, 2016).

Costa Rica es el cuarto país, a nivel mundial, en consumo per cápita de atún enlatado, se estima que cada costarricense consume en promedio 2,5 kg al año. Cada mes se consumen 5,5 millones de latas de atún, siendo en el Gran Área Metropolitana donde se consume el 60 % del total (Corrales, 2016).

Para el año 2012, el atún en conserva solo o con vegetales, en agua o aceite, se ubicaba en el séptimo puesto en las importaciones realizadas en Costa Rica, lo que representa más de 268 millones de dólares (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2012).

En el año 2015, el valor de las importaciones de pescados, moluscos y crustáceos en conserva fue de \$ 53 089 155 millones de dólares, de los cuales el atún representó el 87,57 % y las sardinas en conservas el 5,65 % (Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, 2016).

Los principales países proveedores de atún en conserva, solo o con vegetales son El Salvador que representa un 29 % del total importado, esto debido a que el Grupo Calvo de España instaló una planta en este país para abastecer a la región centroamericana. El segundo país en importancia es Estados Unidos, el cual representa el 19 % y, comparten el tercer lugar, Ecuador y Tailandia, con un 17 % cada uno (Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, 2016).

2.6 Metodología analítica para la determinación de estaño

2.6.1 Espectroscopía de absorción atómica

La configuración electrónica más estable de un átomo corresponde a la de menor contenido energético conocido como "estado fundamental" (Razmilic, 1989). La espectrofotometría de absorción atómica consiste en someter una muestra con átomos en estado fundamental, a una radiación electromagnética con una determinada longitud de onda, característica de cada elemento; los átomos absorben parte de esta radiación pasando a un estado de excitación (Fuentes et al., 1998; Hernández & González, 2002).

Como producto de dicha absorción se da una disminución en la cantidad de radiación resultante del paso a través de la muestra, con respecto a la generada inicialmente, la cual es proporcional a la concentración de átomos presentes en esta (Fuentes et al., 1998; Mañay et al., 2009). Lo anterior se traduce en un término denominado absorbancia.

La Ley de Lambert-Beer explica que la absorbancia de la radiación a una longitud de onda específica es directamente proporcional a la distancia recorrida por el rayo a través de la muestra y a la concentración de la especie absorbente presente en la misma (Amorós & Barrero, 2016; Rocha & Teixeira, 2004), lo cual se expresa en la Ecuación 1.

Ecuación 1. Ley de Lambert-Beer

$$A = \epsilon * c * l$$

Donde:

A= Absorbancia

ϵ = Coeficiente de absorptividad

c= Concentración

l= Longitud

Los saltos energéticos, que se dan al absorber energía, son propios de cada elemento, así como la longitud de onda requerida para la transición entre el estado fundamental de un átomo y el primer estado excitado, llamada longitud de onda de resonancia y se representa con el símbolo λ (González, 2010a; Razmilic, 1989), en el caso del estaño es de 235,5 nm (Mañay et al., 2009).

La espectroscopía de absorción atómica utiliza una fuente de radiación electromagnética que, por lo general, es una lámpara de cátodo hueco, que consiste en un cilindro de vidrio sellado al vacío relleno con un gas inerte, el cual posee un ánodo y un cátodo elaborado parcial o totalmente del metal a analizar, por lo cual emite una longitud de onda característica de este metal (Gallego et al., 2015; González, 2010b).

Además, los espectrómetros de absorción atómica cuentan con un sistema de nebulización y atomización que permite evaporar la muestra y convertir parte de esta en átomos libres en estado fundamental, sobre los cuales se hace incidir la radiación electromagnética (Gallego et al., 2015; Razmilic, 1989). Seguidamente, posee un monocromador que permite

seleccionar la longitud de onda del elemento a determinar, un detector sensible a la radiación y un analizador de la señal (Gallego et al., 2015; González, 2010b)

Para realizar la determinación del elemento de interés mediante espectroscopía de absorción atómica, se requiere un proceso previo de preparación de la muestra, con el fin de descomponer la matriz y dejar el analito en disolución (Mendoza et al., 2014). Un método tradicional para su obtención es por medio del uso de ácidos minerales en caliente y la digestión a temperaturas elevadas. Es muy importante vigilar la calidad de los reactivos utilizados ya que deben ser indicados para el análisis de trazas de metales pesados, con el fin de evitar la contaminación de las muestras (Skoog et al., 2001).

En la actualidad se dispone de equipos como los digestores de microondas, que facilitan el tratamiento previo de la muestra. Permiten ahorro de tiempo, evitan la pérdida de elementos volátiles, así como la contaminación de las muestras al utilizar pequeñas cantidades de ácido, además se pueden procesar varias muestras al mismo tiempo (Gallegos, W.; Vega, M.; Noriega, 2012).

2.6.1.1 Espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito

La espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito, consiste en un cilindro de grafito abierto en ambos extremos, con un orificio central por donde se introduce la muestra (Villegas et al., 2006). El tubo es calentado en etapas, por medio de una corriente eléctrica controlada con el fin de remover el solvente y componentes de la matriz; y lograr la atomización del analito en el camino óptico para que la señal pueda ser detectada (Mañay et al., 2009).

El uso de la plataforma permite que mientras se da el aumento rápido de temperatura dentro del tubo, la muestra se caliente paulatinamente, de forma que la atomización se dé en un ambiente con temperatura constante, lo que disminuye los errores de medición (Harris, 2007; Santiago, 2007).

El material utilizado para elaborar el tubo debe ser inerte, poseer buena conductividad eléctrica y térmica, alta pureza, así como bajo coeficiente de expansión y baja porosidad (Santiago, 2007). Como lo indican Pazos (2007); Santiago (2007) y Mañay, Clavijo y Díaz (2009), las principales etapas que se desarrollan son las siguientes:

- ✓ Secado: la muestra se calienta a una temperatura un poco menor al punto de ebullición del disolvente (generalmente de 80 °C a 180 °C) con el objetivo de que este se evapore.
- ✓ Mineralización: se da un aumento de la temperatura (de 350 °C a 1600 °C) con el fin de destruir la matriz de la muestra (materia orgánica), sin afectar el analito a determinar, a través de un aumento de temperatura menor a la requerida para la atomización del analito.
- ✓ Atomización: el horno alcanza rápidamente altas temperaturas (de 1800 °C a 2800 °C) para que se formen átomos libres del analito de interés, procurando la atomización completa.
- ✓ Limpieza: se eleva considerablemente la temperatura por un corto tiempo para eliminar residuos que hayan quedado y así evitar interferencias en análisis posteriores.
- ✓ Disminución de temperatura: hasta llegar a temperatura ambiente.
- ✓ Las temperaturas utilizadas deben ser optimizadas según el tipo de analito y la composición de la matriz, además se debe evitar la pérdida de muestra por salpicaduras durante la atomización (Santiago, 2007).

Durante la etapa de atomización, los átomos son retenidos en el tubo en dirección del campo óptico durante un período de tiempo mayor que en la técnica por llama, razón por la cual aumenta la sensibilidad y se alcanza un límite de detección menor, a niveles de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Mañay et al., 2009; Rodríguez, 1999). Además, a diferencia de esta última, se requiere un volumen muy pequeño de muestra durante la determinación del analito de interés (Santiago, 2007; Villegas et al., 2006).

2.6.1.2 Interferencias

Una interferencia se puede definir como cualquier factor que hace cambiar la señal aun cuando la concentración del analito se mantiene (Harris, 2007).

- Interferencias espectrales

Se presentan cuando otras radiaciones alcanzan al detector a una longitud de onda muy cercana a la radiación del elemento de interés (Gomis, 2008).

Uno de los factores que produce interferencia espectral es cuando la radiación de un "cuerpo negro" llega al detector, lo que se manifiesta por un aumento en la señal del ruido lo que disminuye el rendimiento analítico (Mañay *et al.*, 2009). Otro factor de interferencia según Mañay *et al.* (Mañay *et al.*, 2009) es la absorción de fondo, la cual se manifiesta como una atenuación de la luz a la longitud de onda del analito producto de componentes presentes en la matriz.

Algunas de las técnicas empleadas para controlar las interferencias espectrales son mediante el uso de modificadores de matriz y la corrección de fondo por efecto Zeeman (Kastenmayer, 1997).

- Interferencias no espectrales

Son provocadas por cualquier componente de la muestra que cause la disminución en la atomización del analito; y son corregidas con el uso de adiciones de estándar y con tubos de grafito con plataforma L'vov (Mañay *et al.*, 2009).

3. Marco metodológico

Esta investigación se realizó en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), del SENASA, del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en la Unidad de Residuos y Contaminantes en Alimentos de Origen Acuático (RECAA). El trabajo se dividió en tres etapas; la primera consistió en la optimización de las condiciones instrumentales del equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito y del proceso de digestión microondas de las muestras, para la determinación de estaño en atún y en sardina enlatados. La segunda etapa consistió en la determinación de los parámetros de desempeño del método implementado en esta investigación. La tercera etapa incluyó demostrar la viabilidad del método desarrollado en esta investigación con muestras reales sardinas y atunes enlatados de interés comercial.

Con el objetivo de llevar a cabo las primeras dos etapas, se utilizaron las matrices: atún en agua, atún en aceite, sardina en salsa de tomate y sardina en aceite; ya que estas son las que el SENASA requiere actualmente para realizar la verificación del contenido de estaño. Para la ejecución de la tercera etapa se coordinó con la Dirección de Inocuidad de Productos de Origen Animal (DIPOA) del SENASA, quien realizó la toma de muestras, de las matrices anteriormente mencionadas, en una planta de producto pesquero enlatado.

3.1 Optimización de las condiciones instrumentales para la determinación de Sn

3.1.1 Optimización de las condiciones del equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito

Se prepararon y analizaron estándares de diferentes concentraciones para evaluar la respuesta (absorbancia) del equipo espectrofotómetro de absorción atómica marca Agilent, AA-280Z con horno de grafito GTA-120, series: DE12490003 y MY12500003 respectivamente; el cual utiliza el software

SpectrAA versión 5.4 PRO y que, con base en éste, se utilizaron las condiciones instrumentales que se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones instrumentales recomendadas para la determinación de Sn por el software SpectrAA versión 5.4 PRO del equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito. Las etapas del programa corresponden a las variaciones en la temperatura durante el período en el que se realiza la determinación del Sn

Gas:	Argón	Longitud de onda (nm):	235,5
Modificador de matriz:	Paladio 500 mg/L Volumen: 10 µL	Corriente de lámpara (mA):	7
Programa de temperatura del horno de grafito			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo (L/min)
1	85	5	0,3
2	95	40	0,3
3	120	10	0,3
4	700	5	0,3
5	700	1	0,3
6	700	2	0
7	2600	1	0
8	2600	2	0
9	2600	2	0,3

Con base en las pruebas realizadas, se estableció el uso de una disolución intermedia de 150 µg/L de Sn, preparada a partir de una disolución estándar de Sn 1000 mg/L en HCl 2 mol/L, marca Merck, número de lote: HC74669642, con la cual se elaboró la curva de calibración en un rango de trabajo 15 µg/L a 150 µg/L, lo que corresponde a un ámbito de trabajo en matriz de 1,88 mg/kg a 18,75 mg/kg. En el Cuadro 2 se detallan las concentraciones de los patrones utilizados. Dichas curvas se prepararon en ácido nítrico 2 % y en extracto limpio de cada una de las matrices de estudio, para evaluar el comportamiento del método con cada una ellas. Se utilizó el coeficiente de determinación de las curvas de calibración como criterio para optimizar la linealidad y establecer el ámbito de trabajo.

Cuadro 2. Concentración de los patrones de la curva de calibración utilizada en la determinación de Sn mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito

Patrón	Concentración de Sn en disolución (µg/L)	Concentración de Sn en matriz (mg/kg)
1	15,0	1,88
2	30,0	3,75
3	45,0	5,63
4	75,0	9,38
5	105,0	13,13
6	135,0	16,88
7	150,0	18,75

3.1.2 Optimización del proceso de digestión de la muestra

Se realizó la digestión de las muestras para eliminar la materia orgánica y dejar el Sn en disolución, para lo cual se midió una alícuota de 0,2 g ± 0,1 mg, en el tubo de digestión, a la cual se le agregó 1,5 mL de ácido nítrico concentrado calidad ultratrazas (HNO₃) (69 a 70) %, marca J.T. Baker, número de lote 0000137558 y 50 µL de peróxido de hidrógeno 30 % calidad trazas marca Sigma-Aldrich, número de lote: BCCB1748. El tubo se colocó en un digestor de microondas marca Milestone UltraWave (Single Reaction Chamber -SRC- Microwave Digestion), serie 19021120, aplicando el programa que se detalla en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Programa para la digestión de muestras de producto pesquero enlatado para el análisis de Sn en digestor microondas

Etapa de digestión	Tiempo (min)	Temperatura 1 (°C)	Temperatura 2 (°C)	Presión (bar)	Potencia (W)
1	0 a 20	Ambiente	220	110	1500
2	20 a 30	220	220	110	1500

La evaluación cualitativa del proceso de digestión de la muestra se realizó mediante la revisión de la apariencia del extracto digerido, mismo que no debía presentar sólidos suspendidos, turbidez o coloración fuerte, de

acuerdo con lo establecido en el procedimiento de determinación de metales pesados por espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GFAAS) (RECAA, 2020), utilizado actualmente para la determinación de plomo y cadmio. Por otro lado, se utilizó el porcentaje de recuperación como parámetro para establecer cuantitativamente la factibilidad de las condiciones instrumentales; para tal fin se realizó la fortificación de dos muestras de cada una de las matrices de estudio a una concentración de 8,75 mg/kg lo que corresponde al punto medio de la curva. La determinación del Sn se realizó utilizando una curva de calibración preparada en HNO₃ 2 % y se determinó el promedio de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada matriz.

Por otra parte, se estableció el promedio de los porcentajes de recuperación de Sn, de dos muestras fortificadas de cada una de las matrices de estudio, utilizando extracto de la misma matriz para preparar la curva de calibración. Es decir, se interpolaron los resultados de la absorbancia de muestras de atún en agua sobre una curva de calibración elaborada a partir de un extracto de atún en agua. El procedimiento se aplicó de igual forma para las otras matrices en estudio.

3.2 Determinación de los parámetros de desempeño del método para la determinación de Sn en atún y sardina enlatada

La determinación de los parámetros de desempeño se realizó según lo establecido en el procedimiento de Determinación de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA del LANASEVE y con base en lo establecido en el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N° 836/2011 del 19 de agosto de 2011, en el cual se definen tanto los parámetros de desempeño, como los criterios de aceptación aplicables a los métodos de análisis de Sn, para los países miembros de la UE y terceros países (Reglamento (UE) N° 836/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011 p, 2011). A continuación, se describen los parámetros de desempeño evaluados:

- **3.2.1 Linealidad y ámbito de trabajo.** Se preparó una disolución patrón de 150 µg/L de Sn en HNO₃ 2 % y en extracto de cada una de las matrices de estudio, a partir de las cuales se prepararon 7 patrones que conformaron la curva de calibración, además de llevarse a cabo la lectura de un blanco reactivo o matriz según correspondiera. Este procedimiento se realizó seis veces (desde la preparación de la disolución patrón). Se graficaron las curvas de calibración y se evaluó la linealidad de estas, por medio de la determinación del coeficiente de determinación promedio y su comparación con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza ANOVA empleando el programa estadístico Minitab versión 18 y se aplicaron las pruebas de Tukey y Fisher, a un 95 % de confianza para comparar los coeficientes de determinación promedio. El ámbito de trabajo se definió de acuerdo con la linealidad del equipo y el límite máximo permitido de Sn en atún y sardinas enlatados.
- **3.2.2 Efecto matriz.** Para la determinación del efecto matriz se fortificaron muestras de cada una de las matrices en estudio a un nivel de concentración de 8,75 mg/kg, correspondiente al punto medio de la curva. Las muestras fortificadas fueron leídas sobre curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y en extracto de cada una de las matrices en estudio. Los porcentajes de recuperación promedio obtenidos fueron analizados con el fin de determinar si había una variación de los resultados con respecto al extracto matriz utilizado en la elaboración de la curva de calibración y, adicionalmente, fueron evaluados con respecto a la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea (2002) y el Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX (2009), dado que la Decisión (CE) N° 836/2011 no cuenta con un criterio de aceptación para este parámetro.

- 3.2.3 Veracidad.** La veracidad se evaluó a través del porcentaje de recuperación en las cuatro matrices de estudio, atún en agua, atún en aceite, sardina en aceite y sardina en salsa de tomate. La normativa de referencia establece la evaluación de este parámetro a la mitad del Límite Máximo Permitido (LMP), a nivel del LMP y a 1,5 veces el valor del LMP. Sin embargo, el método en cuestión determina concentraciones más bajas de estaño en un rango lineal, por lo cual, se procedió a realizar los análisis a 6 niveles de concentración a saber: 3 niveles en el ámbito lineal de la curva de calibración y 3 niveles cercanos al LMP; estos valores se detallan en el Cuadro 4. Por medio de la técnica de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, se determinó de forma directa, la concentración de las fortificaciones realizadas en los 3 primeros niveles, los cuales se encuentran dentro de la curva. Para las fortificaciones realizadas en concentraciones cercanas al límite máximo permitido, se tomó un volumen de 400 μL y se agregó en un balón aforado de 10 mL, completando el volumen con agua desionizada, con el fin de que de las concentraciones estuvieran dentro del ámbito de la curva de calibración para su lectura. Se determinó el porcentaje de recuperación promedio para cada nivel de concentración, empleando las cuatro matrices de estudio.

Cuadro 4. Datos para la preparación de muestras fortificadas a diferentes niveles de fortificación para la evaluación de la veracidad y la precisión intermedia.

Niveles de fortificación	Volumen (μL) de disolución de Sn	Concentración (mg/L) de la disolución de Sn	Concentración (mg/kg) de Sn sobre matriz
1	37,5	10	1,8
2	175	10	8,75
3	375	10	18,75
4	200	100	100
5	400	100	200
6	59,8	1003	300

- **3.2.4 Precisión.** Expresa la coincidencia entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples análisis de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas y está relacionada inversamente con la dispersión de los datos.

3.2.4.1 Precisión instrumental. Se determinó analizando la dispersión de 6 lecturas diferentes de un punto de la curva a partir de una misma muestra y se expresó como coeficiente de variación.

3.2.4.2 Precisión intermedia o reproducibilidad. Al igual que para el parámetro de veracidad, la precisión intermedia o reproducibilidad debe ser evaluada a la mitad del Límite Máximo Permitido (LMP), a nivel del LMP y a 1,5 veces el valor del LMP, y dado que el presente método determina concentraciones más bajas de estaño en un rango lineal, se realizó el análisis a los niveles de concentración definidos en el Cuadro 4. Con los porcentajes de recuperación obtenidos en cada nivel de concentración se calculó la dispersión de los datos, expresada como coeficiente de variación.

El criterio de aceptación establecido para la precisión intermedia o reproducibilidad establece que el valor de $HORRAT_R$ debe ser inferior a dos. El cálculo de $HORRAT_R$ para concentraciones entre $1,2 \times 10^{-7}$ mg/kg y 0,138 mg/kg, como es el caso de esta investigación, implica el uso de la Ecuación 2 para la estimación de la desviación estándar relativa según Horwitz:

Ecuación 2: Ecuación de Horwitz

$$RSD_R = 2C^{(-0.15)}$$

Donde:

RSD_R = desviación estándar relativa de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad $[(S_R/\bar{x}) \times 100]$

C = tasa de concentración (es decir, 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg)

Una vez calculado el CV y el RSD_R para cada una de las concentraciones evaluadas, se calculó el $HORRAT_R$ según lo establece la Ecuación 3.

Ecuación 3: Fórmula para el cálculo de $HORRAT_R$

$$HORRAT_R = CV/RSD_R$$

Donde:

CV = coeficiente de variación

RSD_R = desviación estándar relativa de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad $[(S_R/\bar{x}) \times 100]$

- **3.2.5 Límite de detección (LD).** Es la mínima concentración del analito, Sn en este caso, que puede ser detectada por el método utilizado. Se realizó la lectura de 20 blancos matriz y con estas, se determinó el promedio de las lecturas de las absorbancias obtenidas y su desviación estándar. Al valor promedio de las absorbancias se le sumó tres veces la desviación estándar y a ese valor se interpoló en la curva de calibración promedio, para determinar la mínima concentración detectable. Lo anterior de acuerdo con la Ecuación 4:

Ecuación 4: Fórmula para el cálculo del límite de detección

$$\text{Límite de detección} = b + 3 * S_x$$

Donde:

X = promedio de las lecturas dadas por el equipo

S_x = desviación estándar de los datos

- **3.2.6 Límite de cuantificación (LC).** A partir de la lectura de los 20 blancos matriz empleados para la determinación del límite de detección, se determinó el promedio de las absorbancias y su desviación estándar. El valor obtenido de la suma del promedio más 10 veces la desviación estándar se interpoló en la curva de calibración promedio, para obtener la concentración mínima cuantificable; esto en concordancia con la Ecuación 5:

Ecuación 5: Fórmula para el cálculo del límite de cuantificación

$$\text{Límite de cuantificación} = b + 10 * S_x$$

Donde:

X = promedio de las lecturas dadas por el equipo

S_x = desviación estándar de los datos

Se analizaron muestras fortificadas a los niveles del LD y del LC, para evaluar precisión y la veracidad.

- **3.2.7 Sensibilidad.** La sensibilidad de calibración se define como el cambio de la respuesta obtenida, dividido por el correspondiente cambio de la concentración del analito, el Sn en este caso; la cual se determinó como el promedio de la pendiente de la ecuación de la curva de calibración. Los promedios de las pendientes de las ecuaciones obtenidas de curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y en extracto de cada una de las matrices de estudio fueron comparados mediante la prueba de Tukey del análisis ANOVA, empleando el programa estadístico Minitab versión 18, con un 95 % de confianza.
- **3.2.8 Selectividad.** Es la capacidad que tiene el método de identificar el elemento de interés en presencia de otro u otros elementos. Se evaluó mediante la lectura de blancos matriz fortificados con una cantidad conocida de estaño a diferentes concentraciones.
- **3.2.9 Especificidad.** Es la capacidad que tiene el método de dar negativo cuando la muestra no tiene el analito a determinar. Se evaluó mediante la preparación y lectura de 20 blancos matriz (repeticiones), cuyos resultados debían confirmar que la muestra no tenía estaño.
- **3.2.10 Robustez.** Este parámetro no aplica al método en cuestión debido a que no se van a hacer variaciones en el diseño experimental. Puntos críticos como la cantidad de muestra, volumen de digestión (ácido nítrico y peróxido de hidrógeno), programa del digestor microondas, volumen de aforo del extracto digerido, las condiciones

experimentales del equipo de espectroscopía de absorción atómica, las matrices de interés; fueron definidos durante la implementación y la determinación de los parámetros de desempeño del método con la jefatura de la Unidad RECAA. En caso de requerirse cambios, posterior a la realización del presente estudio, se evaluarán los mismos para determinar si hay cambios significativos o no, en los resultados obtenidos.

- **3.2.11 Estimación de la incertidumbre.** Se utilizó el modelo de caja negra para el cálculo de la incertidumbre (Linsinger, 2005). Dicho modelo consiste en utilizar los resultados de la evaluación de la reproducibilidad o precisión intermedia de la metodología como se muestra en la Ecuación 6:

Ecuación 6: Cálculo de la incertidumbre para la cuantificación de Sn en sardinas y atunes enlatados

$$U_{exp} = k \times CV \times Conc$$

Donde:

U_{exp} : Incertidumbre expandida

k: Factor de cobertura (k: 2, con un 95 % de confianza)

CV: Coeficiente de variación obtenido

Conc = Concentración de la muestra en mg de estaño/ kg

3.3 Evaluación del método con muestras reales de sardina y atún enlatado

3.3.1 Definición de la muestra

Las muestras sujetas a estudio fueron atunes (aceite y agua) y sardinas (aceite y salsa de tomate), las cuales fueron tomadas en el mes de mayo de 2020 por la DIPOA. Para la determinación de Sn se analizaron cinco muestras de cada una de las matrices en mención, es decir, cinco latas de cada una de estas.

3.3.2 Muestreo

La recolección de las muestras fue realizada en una planta de producción de producto pesquero enlatado por la DIPOA, dado que es una de las direcciones encargadas de la toma de muestras para los monitoreos realizados por el SENASA. Dicha toma de muestras fue realizada con el objetivo de cumplir con los análisis requeridos en esta investigación y con el resultante beneficio para el productor al contar con información con respecto a la concentración de Sn encontrada en sus productos.

3.3.3 Recepción de la muestra

Las muestras fueron trasladadas directamente a la Unidad RECAA del LANASEVE por parte de personal oficial del DIPOA, y se les asignó una identificación inequívoca.

3.3.4 Procesamiento y almacenamiento de la muestra

Las muestras enlatadas se almacenaron a temperatura ambiente previo a la determinación de estaño. Una vez abierta cada lata, se procedió a procesar el contenido, lo cual consistió en colocarlo en un tamiz hasta que el líquido (aceite, salsa de tomate o agua) se hubiera escurrido, posteriormente se colocó en un procesador de alimentos para triturarlo hasta conseguir una masa de músculo molido y homogéneo. Concluido dicho procedimiento, el producto obtenido se colocó en una bolsa con una identificación única para cada muestra y se almacenó a una temperatura ≤ 0 °C durante tres meses. El procedimiento explicado anteriormente se llevó a cabo de forma independiente para cada una de las muestras, tras el lavado del tamiz con el fin de evitar la contaminación cruzada entre las muestras.

3.3.5 Determinación de estaño

La cuantificación del Sn se realizó mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito implementada en el presente estudio. La absorbancia obtenida por las muestras se interpoló en la curva de calibración mostrada en el Cuadro 2 del apartado punto 1.1.1, con el fin de determinar la concentración en miligramos de Sn por kilogramo de muestra

(mg/kg). Los valores obtenidos se compararon con límite máximo permitido de 200 mg/kg establecido en el RTCR 409:2008 Reglamento de Límites Máximos Microbiológicos y de Residuos de Medicamentos y Contaminantes para los Productos y Subproductos de la Pesca y de la Acuicultura Destinados al Consumo Humano (2008).

4. Resultados y discusión

4.1 Optimización condiciones instrumentales para determinación de estaño

4.1.1 Equipo de medición espectrómetro de absorción atómica

Tal como se estableció en el apartado 1.1.1, el rango de trabajo de la curva de calibración de Sn comprendió concentraciones de 15 µg/L a 150 µg/L, para lo cual se utilizaron disoluciones de 150 µg/L de Sn, preparadas en HNO₃ 2 % y en los extractos de cada una de las matrices de estudio, bajo las condiciones instrumentales indicadas en el Cuadro 1. Las concentraciones de Sn en matriz, de los patrones que conformaron las curvas de calibración se detallan en el Cuadro 2.

Las curvas de calibración obtenidas y que fueron preparadas en disolución de HNO₃ 2 % y en diferentes extractos matriz a saber, atún en agua (At-Ag), de atún en aceite (At-Ac), de sardina en aceite (S-Ac) y de sardina en salsa de tomate (S-Tom), se muestran en la Figura 1.

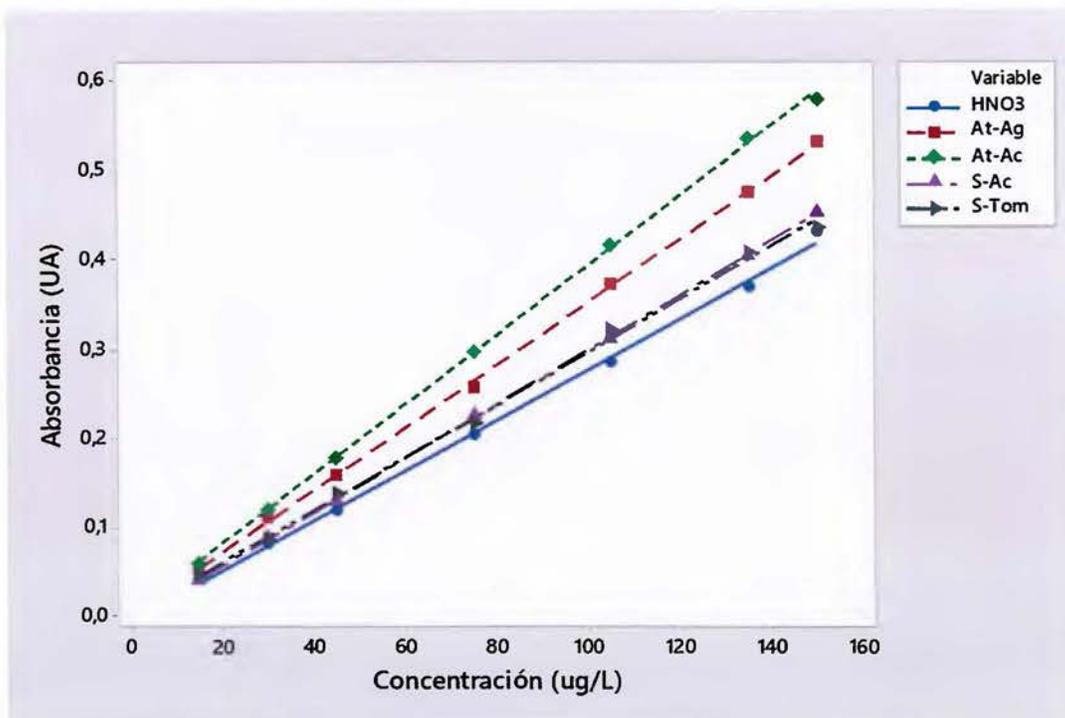


Figura 1. Curvas de calibración de Sn preparadas en HNO₃ 2 %, extracto de atún en agua (At-Ag), de atún en aceite (At-Ac), de sardina en aceite (S-Ac) y de sardina en salsa de tomate (S-Tom)

Para cada curva de calibración se estableció la respectiva ecuación de la recta y el coeficiente de determinación, los cuales se muestran en el Cuadro 5.

Los resultados del coeficiente de determinación (R^2) que se evidencian en el Cuadro 5 cumplen con el criterio de aceptación de resultados del procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA, el cual corresponde a $> 0,995$.

Cuadro 5. Criterios de linealidad para curvas de calibración de Sn preparadas en HNO₃ 2 % y en extracto de cada una de las matrices de estudio

Extracto	Ecuación de la recta	Coficiente de determinación
HNO ₃ 2 %	$y = 0,0028x - 0,0068$	0,9981
Atún agua	$y = 0,0035x + 0,0004$	0,9997
Atún aceite	$y = 0,0039x + 0,0024$	0,9995
Sardina aceite	$y = 0,0030x - 0,0057$	0,9998
Sardina tomate	$y = 0,0030x + 0,0007$	0,9978

Debido a que los resultados obtenidos cumplen con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA, no se requirió hacer ajustes a las condiciones instrumentales recomendadas por el software SpectrAA versión 5.4 PRO, que se presentan en el Cuadro 1, para la determinación de Sn mediante horno de grafito. Entre las condiciones de trabajo definidas se encuentra el uso una longitud de onda de 235,5; la adición de paladio como modificador de matriz, con el fin de disminuir la volatilidad del Sn y con esto permitir el aumento en la temperatura de calcinación de la muestra (Kastenmayer, 1997); y una variación en la temperatura de 85 °C a 2600 °C. Dados los resultados satisfactorios en la etapa de optimización de las condiciones instrumentales, las mismas serán utilizadas tanto para evaluar la etapa de digestión de las muestras como la posterior determinación de los parámetros de desempeño del método.

4.1.2 Digestión de la muestra

Se evaluó el procedimiento de digestión de la muestra que se indica en el apartado 3.1.2, por medio de los porcentajes de recuperación promedio de Sn, obtenidos al analizar dos muestras fortificadas de cada una de las matrices en estudio, mediante el método de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito. En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos al emplear una curva de calibración de Sn preparada en HNO₃ 2 %. El mayor porcentaje de recuperación promedio de Sn se obtuvo en las muestras de atún en aceite; en contraste, el obtenido para sardinas en salsa de tomate correspondió al porcentaje de recuperación promedio más bajo.

Cuadro 6. Porcentajes de recuperación promedio obtenidos al cuantificar el Sn en muestras de cada una de las matrices en estudio, empleando una curva de calibración de Sn preparada en HNO₃ 2 %, mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito

Extracto/Matriz control	Porcentaje recuperación promedio de Sn			
	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate
HNO ₃	93,6	102,7	88,7	84,9

Adicionalmente, se determinó el promedio de los porcentajes de recuperación de Sn, de dos muestras de cada una de las matrices de estudio, leídas sobre una curva de calibración de Sn preparada en extracto de la misma matriz. Los resultados obtenidos se encuentran entre 95 % y 105 % y se detallan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Porcentajes de recuperación promedio de Sn obtenidos al analizar muestras de las matrices de estudio en curvas de calibración preparadas en extracto de matriz, mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito

Muestra analizada	Extracto matriz en curva de calibración	Porcentaje recuperación promedio
At-Ag	At-Ag	95,2
At-Ac	At-Ac	104,9
S-Ac	S-Ac	101,1
S-Tom	S-Tom	99,2

Atún en agua (At-Ag), de atún en aceite (At-Ac), de sardina en aceite (S-Ac) y de sardina en salsa de tomate (S-Tom)

Los porcentajes de recuperación mostrados en los Cuadros 6 y 7, cumplen con el criterio de aceptación establecido de (80 a 110) % según la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea y con respecto al Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX que lo define (70 a 110) %. El cumplimiento de estos criterios demuestra que las condiciones y parámetros del método de digestión de la muestra, quedaron optimizados inicialmente, para continuar con la evaluación de los parámetros de desempeño. Ambas normativas utilizadas

como referencia definen estándares con respecto a métodos analíticos dirigidos a demostrar la inocuidad de los productos de origen animal.

El uso de calcinación por vía húmeda en vasos cerrados para la digestión de las muestras como, por ejemplo, el equipo de microondas permite descomponer adecuadamente las muestras ya que utiliza temperaturas y presiones elevadas. Adicionalmente, este sistema requiere pequeñas cantidades de muestra y de ácido lo que elimina el riesgo de pérdida de elementos volátiles, esto es evidente en la prueba realizada al obtener porcentajes de recuperación que cumplen con los criterios de aceptación evaluados (Kastenmayer, 1997).

4.2 Resultados de la determinación de los parámetros de desempeño del método para la determinación de estaño

4.2.1 Linealidad y ámbito de trabajo

Durante la optimización del método se analizaron curvas de calibración individuales que permitieron establecer un patrón lineal de la respuesta del equipo respecto a la concentración. Por su parte, la determinación de la linealidad y el ámbito de trabajo implicó realizar más curvas de calibración que permitieran caracterizar dichos parámetros en condiciones de precisión intermedia. Se prepararon 30 curvas de calibración a partir de 6 estándares de 150 µg/L de Sn en HNO₃ 2 % y 6 en cada uno de los extractos de las matrices de estudio. Los coeficientes de determinación obtenidos para cada una de las curvas de calibración de Sn se muestran en el Anexo 1 y los valores van desde 0,9967 hasta 1,0000.

En el Cuadro 8 se presentan los coeficientes de determinación promedio obtenidos a partir de las curvas de calibración de Sn preparadas en cada uno de los extractos; el menor valor promedio obtenido corresponde a las curvas de calibración preparadas en extracto de sardina en aceite y fue de 0,9981. Se determinó, en todos los casos, que los resultados cumplen con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA, que corresponde a un R² superior a 0,995. Al realizar el

análisis de varianza ANOVA y al aplicar las pruebas de Tukey y Fisher, a un 95% de confianza, como se planteó en el punto 3.2.1, los promedios de R^2 comparten una misma letra lo que indica que no se presentó diferencia significativa entre los valores medios, tal como se muestra en el Anexo 2.

Cuadro 8. Comparación de los coeficientes de determinación promedio de las curvas de calibración de Sn preparadas en HNO_3 2 % y en extracto de las matrices de estudio con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA

Extracto	Promedio coeficiente de determinación	Criterio de aceptación	Cumplimiento
HNO_3 2 %	0,9994	> 0,995	Cumple
Atún agua	0,9992		
Atún aceite	0,9990		
Sardina aceite	0,9981		
Sardina tomate	0,9992		

El cumplimiento del criterio de aceptación indica que el comportamiento del método es lineal en el ámbito de trabajo de 1,88 mg/kg a 18,75 mg/kg al utilizar HNO_3 2 % y el extracto de las matrices de estudio para preparar las curvas de calibración, por tanto, dicho ámbito de concentraciones puede ser utilizado para la determinación de Sn en las matrices de estudio.

4.2.2 Efecto matriz

Para la determinación del efecto matriz, es decir, establecer si la matriz influye o modifica la respuesta obtenida, se fortificaron muestras de cada una de las matrices en estudio en un nivel de concentración de 8,75 mg/kg lo que corresponde al punto medio de la curva. Las muestras fortificadas fueron leídas sobre curvas de calibración preparadas en HNO_3 2 % y en extracto de cada una de las matrices en estudio. Al comparar los porcentajes de recuperación promedio que se presentan en el Cuadro 9 con el criterio de aceptación establecido en la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea de (80 a 110) %, solo los valores que presentan un "1" cumplen con dicho criterio, los demás

valores son menores o mayores a lo establecido, razón por la cual no cumplen. Al realizar la evaluación con respecto al Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX que lo define (70 a 110) %, al ser un rango más amplio, solo las lecturas de las muestras de atún interpoladas en curvas de calibración de Sn preparadas en extracto de sardina no cumplen con lo establecido. Los resultados de cada muestra analizada en curvas de calibración preparadas sobre HNO₃ 2 % y en extracto de cada una de las matrices de estudio se detallan en el Anexo 3.

Cuadro 9. Porcentajes de recuperación promedio de Sn obtenidos al analizar mediante espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, muestras fortificadas de las diferentes matrices en estudio sobre curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y en extracto de dichas matrices; y su comparación con respecto a la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea y el Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX

		Extracto utilizado para preparar la curva de calibración de Sn				
		Matriz analizada	HNO ₃ 2 %	At-Ag	At-Ac	S-Ac
Porcentaje de recuperación	At-Ag	92 ^(1,2)	98 ^(1,2)	110 ^(1,2)	131	116
	At-Ac	97 ^(1,2)	101 ^(1,2)	103 ^(1,2)	133	121
	S-Ac	78 ⁽²⁾	75 ⁽²⁾	86 ^(1,2)	100 ^(1,2)	90 ^(1,2)
	S-Tom	79 ⁽²⁾	78 ⁽²⁾	88 ^(1,2)	104 ^(1,2)	94 ^(1,2)

Atún en agua (At-Ag), de atún en aceite (At-Ac), de sardina en aceite (S-Ac) y de sardina en salsa de tomate (S-Tom)

⁽¹⁾ Los porcentajes de recuperación sombreados se encuentran entre el (80 y 110) % por ende, cumplen con lo establecido en la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea.

⁽²⁾ Cumplen con el criterio de aceptación indicado en el Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX de (70 a 110) %.

La evaluación del efecto matriz permite establecer las curvas de calibración en matriz que pueden utilizarse para analizar las muestras objeto de ensayo. Según lo establecido en el Cuadro 9, se definió que las muestras de atún deben ser leídas en curva de calibración preparadas en extracto de atún en agua o atún en aceite; las muestras de sardina deben ser leídas en curvas de calibración preparadas en extracto de sardina en aceite o sardina en salsa

de tomate, con el fin de cumplir con lo establecido en las normativas evaluadas. Por tanto, no se puede utilizar una misma curva de calibración para cuantificar el Sn en todas las matrices de estudio.

4.2.3 Veracidad

La veracidad del método se caracterizó a partir de los porcentajes de recuperación promedio de Sn obtenidos para cada uno de los niveles de concentración que se presentan en el Cuadro 10. Estos porcentajes de recuperación cumplen con los rangos de referencia establecidos por la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea, y con respecto al Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX, los cuales son de (80 a 110) % y de (70 a 110) %. Sin embargo, cabe mencionar que los resultados obtenidos para muestras de sardina en aceite y sardina en salsa de tomate a concentraciones de Sn de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg, no cumplen con estos criterios, razón por la cual no fueron incluidos en el cálculo de los porcentajes de recuperación y, por ende, en la evaluación de la veracidad. En el Anexo 4 se presentan los porcentajes de recuperación promedio de Sn obtenidos para cada matriz, en cada nivel de concentración.

Cuadro 10. Resultados obtenidos al evaluar los porcentajes de recuperación promedio de Sn a diferentes niveles de concentración, con respecto a los criterios de aceptación establecidos

Niveles de concentración de Sn en matriz (mg/kg)	% Recuperación promedio	Decisión 2002/657/CE (80 a 110) %	Reglamento CAC/GL 71-2009 (70 a 110) %
1,8	96	Cumple	Cumple
8,75	100	Cumple	Cumple
18,75	92	Cumple	Cumple
100*	91	Cumple	Cumple
200*	89	Cumple	Cumple
300*	97	Cumple	Cumple

*A estos niveles de concentración los porcentajes de recuperación promedio corresponden a muestras de atún en agua y atún en aceite. Las muestras de sardina en aceite y sardina en salsa de tomate no fueron consideradas para dicho cálculo debido a que los resultados no cumplen los criterios de aceptación.

Al determinar la concentración de Sn para muestras de sardina en aceite y sardina en salsa de tomate fortificadas a concentraciones de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg, se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 147 %, lo que significa que las concentraciones de Sn obtenidas son superiores a las esperadas. Debido a anterior, se considera que el método, tal y como ha sido desarrollado en el presente estudio no es veraz a estas concentraciones, por lo cual se necesitaría realizar pruebas adicionales que permitan ajustar los resultados a los criterios de aceptación.

Cabe destacar que esta limitación en la veracidad a niveles superiores a la mitad del LMP en la concentración de Sn en sardina, hace que el LANASEVE no pueda utilizar el método para dicha matriz ya que el Laboratorio debe tener la capacidad de declarar la no conformidad de una muestra con respecto al LMP, lo cual quiere decir que si una muestra de sardina presenta una concentración cercana o superior a 200 mg/kg de Sn no puede ser cuantificada con certeza, esto puede implicar que el resultado se declare como Conforme siendo Violatorio (falso Conforme), o como Violatorio siendo Conforme (falso Violatorio). Un resultado Conforme es aquel que no sobrepasa los límites máximos establecidos, mientras que un resultado Violatorio se da cuando al sumarle la incertidumbre a la concentración obtenida, el resultado de esta suma se encuentra por encima del límite máximo permitido (SENASA, 2016). Lo anterior, a pesar de que los resultados en el intervalo de la curva de concentración sean conformes y que se haya probado el cumplimiento de otros parámetros de desempeño.

4.2.4 Precisión

4.2.4.1 Precisión instrumental

La evaluación de la precisión instrumental se realizó mediante la determinación de Sn en seis réplicas (lecturas) de dos disoluciones preparadas a dos niveles de concentración que coinciden con los dos puntos más bajos de la curva de calibración, ya que, a niveles más bajo de concentración, podría haber una mayor interferencia del ruido instrumental; estos datos se muestran

en el Anexo 5. La dispersión obtenida en las concentraciones de Sn para cada nivel fue expresada como coeficiente de variación. En el Cuadro 11 se presenta la concentración promedio de Sn obtenida para dos niveles teóricos de concentración (15 µg/L y 30 µg/L) y la comparación con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de parámetros de desempeño de la Unidad RECAA que debe ser menor 5 % del coeficiente de variación.

Cuadro 11. Coeficiente de variación para la evaluación de la precisión instrumental por el método de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito y comparación con el criterio de aceptación

Concentración teórica (ug/L)	Concentración promedio obtenida (ug/L)	Coeficiente de variación (%)	Criterio de aceptación < 5 %
15,0	15,4	4,5	Cumple
30,0	29,0	1,9	

Al determinar el cumplimiento de los coeficientes de variación obtenidos en los dos niveles de concentración evaluados con el criterio de aceptación establecido, se puede asegurar que, bajo las mismas condiciones de análisis, es decir, utilizando los mismos reactivos y realizando la lectura de cada una de las disoluciones en repetidas ocasiones, la respuesta del equipo se mantiene estable en el tiempo, dado que la variabilidad es debida a errores aleatorios propios del funcionamiento o respuesta normal del equipo analítico.

En contraste, la repetibilidad evalúa la preparación de las muestras bajo mismas condiciones de análisis (a una misma concentración, mismo analista, equipo y reactivos), pero con muestras preparadas desde la etapa de pesada y digestión (repeticiones).

4.2.4.2 Precisión intermedia o reproducibilidad

Las pruebas para la determinación de la precisión intermedia implicaron la fortificación de muestras de las matrices en estudio a distintas concentraciones de Sn y en diferentes días, así como la determinación de Sn utilizando curvas de calibración preparadas en distintos extractos. Se

fortificaron muestras en 6 niveles de concentración señalados en el Cuadro 12, para cada uno de estos se aplicó la relación establecida para la determinación de $HORRAT_R$, que según lo explicado en el apartado 3.2.3.2 del marco metodológico, relaciona el coeficiente de variación obtenido en las pruebas del presente estudio con respecto al coeficiente de variación calculado con la Ecuación de Horwitz. Con lo anterior se determinó el cumplimiento del criterio establecido en el Reglamento (UE) 2016/582 de la Unión Europea que define un $HORRAT_R$ menor a 2 para todos los niveles de concentración evaluados. Cabe destacar que, a concentraciones en matriz de (100 a 300) mg/kg de Sn, los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras de sardina en aceite y sardina en salsa de tomate no cumplieron con los criterios de aceptación evaluados en el apartado de veracidad, por lo cual, estas matrices no fueron tomadas en consideración en la evaluación con respecto a $HORRAT_R$ realizada en el presente apartado, estos datos se presentan en el Anexo 6.

Cuadro 12. Resultados obtenidos al realizar la evaluación del cumplimiento del criterio de aceptación establecido para la determinación de la precisión intermedia o reproducibilidad del método de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para la determinación de Sn

Niveles de concentración de Sn en matriz (mg/kg)	C.V.	RSD _R %	HORRAT _R	Criterio de aceptación Reglamento (UE) 2016/582 HORRAT _R < 2
1,88	7,05	14,5	0,49	Cumple
8,75	6,47	11,5	0,57	Cumple
18,75	6,26	10,2	0,61	Cumple
100*	3,46	8,0	0,43	Cumple
200*	5,00	7,2	0,70	Cumple
300*	9,73	6,8	1,44	Cumple

*Los resultados obtenidos para concentraciones de Sn 100 mg/kg o superiores, corresponden a muestras de atún en agua y atún en aceite únicamente, debido a que los resultados obtenidos para muestras de sardina no cumplen con lo evaluado en el parámetro de veracidad y por ende no pueden ser evaluados en el presente apartado. C.V.= coeficiente de variación, RSD_R= desviación estándar relativa de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad

El cumplimiento del criterio de aceptación indica que el método tiene una respuesta que cumple con la variabilidad máxima establecida, es decir, que no supera el doble de la estimación de variación del método según Horwitz, al ser evaluado a los diferentes niveles de concentración del analito citados en el Cuadro 12.

El aporte de la veracidad establecida en el apartado anterior, y la presión, determinado en el presente apartado, corresponde a la exactitud del método. Por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos se puede indicar que el método es exacto para las matrices atún en agua y atún en aceite, en el rango de análisis caracterizado.

4.2.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

El LD y el LC se calcularon a partir de la lectura de 20 blancos en matriz de sardina en salsa de tomate, que corresponde al producto que presentó lecturas con mayor señal en muestras de referencia (sin fortificar) durante la optimización del método, de forma que se evaluaron las condiciones más pesimistas para incluir la respuesta de todas las matrices en este parámetro. En el anexo 7 se detallan los cálculos del LD y LC. En el cuadro 13 se muestran el LD y LC obtenidos, además de su evaluación con respecto a la normativa de la Unión Europea Reglamento (UE) 2016/582.

Cuadro 13. Límite de detección y límite de cuantificación y evaluación del cumplimiento del criterio de aceptación

Parámetro	Concentración de Sn (mg/kg)	Criterio de aceptación Reglamento (UE) 2016/582	Cumplimiento
Límite detección	0,6	$\leq 3/10$ LC	Cumple
Límite cuantificación	1,8	≤ 10 mg/kg	

Los valores de LD y LC fueron comprobados al fortificar muestras de sardina en salsa de tomate y se obtuvieron porcentajes de recuperación promedio de Sn de 93,3 % y 93,6 %, respectivamente. En el anexo 8 se detallan los valores individuales obtenidos en esta prueba.

Los valores calculados del LD y del LC definen la forma en que se interpretan los resultados: un valor menor o igual al LD se reporta como "No detectado"; un valor mayor al LD o menor al LC se reporta como "No cuantificable" y para los valores superiores o iguales al LC se reporta la cantidad obtenida con su respectiva incertidumbre.

La importancia de que el método permita determinar concentraciones inferiores al LMP del analito de interés, como en el caso del Sn que es de 200 mg/kg (Reglamento de límites máximos microbiológicos y de residuos de medicamentos y contaminantes para los productos de la pesca y de la acuicultura destinados para consumo humano, 2008), y sobre todo, concentraciones lo más bajas posibles de Sn, ya que estos datos, al igual que con otros metales pesados, permiten realizar estudios toxicológicos que contribuyen al análisis de riesgo por el consumo de productos enlatados, permitiendo establecer decisiones en el muestreo o en el consumo máximo per cápita por semana, medidas preventivas con el sector productor, restablecimiento del LMP, entre otros.

Al comparar la sensibilidad del método desarrollado en esta investigación con la del método de espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) utilizado por Diviš et al. (2017) para realizar la determinación de Sn en frutas en conserva, cuyo LD fue de 0,024 mg/kg, se puede evidenciar que este último método es más sensible, sin embargo, el nivel de LD alcanzado en el presente estudio es suficiente para cumplir con lo establecido en la normativa de la Unión Europea Reglamento (UE) 2016/582.

4.2.6 Sensibilidad

La sensibilidad al nivel de cuantificación se calculó con base en el promedio de las pendientes de las ecuaciones de 6 curvas de calibración elaboradas en HNO₃ 2 % y de 6 curvas de calibración preparadas en extracto de cada una de las matrices de estudio, estos promedios se muestran en el Cuadro 14. En el Anexo 9 se presentan las pendientes de la ecuación de las 30 curvas de calibración de Sn.

Cuadro 14. Pendientes de la ecuación promedio de 6 curvas de calibración de Sn preparadas en HNO₃ 2 % y 6 preparadas en extracto de cada una de las matrices de estudio

	HNO ₃	At-Ag	At-Ac	S-Ac	S-Tom
Pendiente promedio (UAxkg)/mg	0,0032	0,0037	0,0037	0,0026	0,0027

*UA=Unidades de Absorbancia

Atún en agua (At-Ag), de atún en aceite (At-Ac), de sardina en aceite (S-Ac) y de sardina en salsa de tomate (S-Tom)

Al evaluar la similitud de las pendientes promedio de las curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y en los extractos de las matrices en estudio mediante la prueba de Tukey del análisis ANOVA, según se estableció en el punto 3.2.7, se da una agrupación de datos según se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Agrupación obtenida al aplicar la prueba de Tukey del análisis ANOVA utilizando el programa estadístico Minitab versión 18, a un 95 % de confianza, de las pendientes promedio de 6 curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y 6 en extracto de cada una de las matrices en estudio

Curva de calibración	Grupo
HNO ₃	A
Atún agua	A
Atún aceite	A
Sardina aceite	B
Sardina tomate	B

Lo anterior demuestra que el comportamiento del atún en agua y del atún en aceite respecto al HNO_3 no es significativamente diferente. Por lo que una muestra de atún en agua puede ser analizada en extracto de atún en aceite o viceversa; y ambas pueden ser analizadas en HNO_3 . Estos datos respaldan los resultados obtenidos en el estudio de efecto matriz.

4.2.7 Especificidad

La especificidad del método se determinó mediante la lectura de 20 blancos matriz, cuyos resultados confirmaron la ausencia de estaño y de otras señales que no corresponden al analito. En la Figura 2 no se observa un aumento de señal en las UA durante el tiempo que se realiza la determinación de Sn en un blanco matriz de sardina en salsa de tomate. Dicha determinación es representada por una línea azul y otra negra que siguen prácticamente el mismo recorrido, esto debido a que se realiza por duplicado y la concentración dada es un promedio de ambas determinaciones. Las variaciones minúsculas responden a la respuesta aleatoria del equipo que se evaluó en la repetibilidad instrumental.

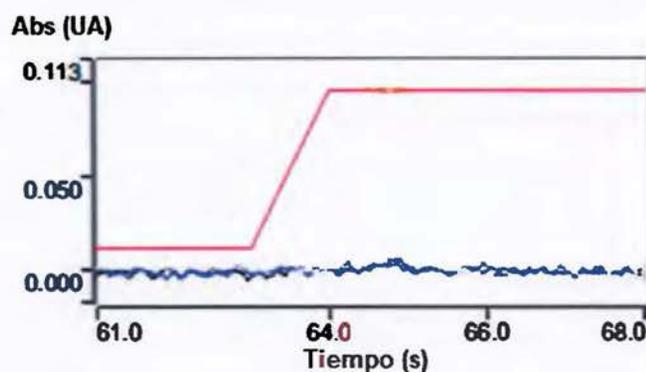


Figura 2. Comportamiento de la absorción durante el tiempo en que se realiza la cuantificación del Sn. La línea roja representa el cambio de temperatura realizado por el equipo, que se detalló en el Cuadro 1 y las líneas superpuestas negra y azul, representan la absorbancia generada ante la concentración de Sn en la muestra evaluada, ya que el equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito realiza la determinación en dos ocasiones. Se empleó el software SpectrAA versión 5.4 PRO

Al realizar la lectura de blancos matriz y observar el comportamiento del equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito se confirma que el método es específico ya que al no haber presencia de Sn, no se produce en respuesta en UA producto de otros elementos o interferencias.

4.2.8 Selectividad

La comprobación de la selectividad del método se realizó a partir de la fortificación de matrices blanco, las cuales al ser analizadas mostraron una señal dependiente de la concentración de Sn. Las determinaciones de Sn se realizaron a una longitud de onda característica de este analito de 235,5 nm.

En la Figura 3 se observa el aumento en las UA conforme aumenta la concentración de Sn al ser analizada una muestra de sardina en aceite, fortificada a diferentes concentraciones.

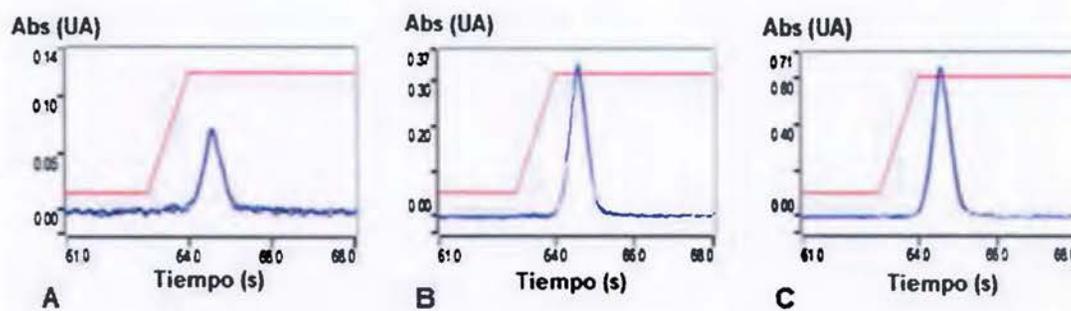


Figura 3. Señal producida en UA por el equipo de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, al analizar muestras con diferente concentración de Sn. A presenta la respuesta producida por una concentración de Sn de 1,88 mg/kg, B presenta una concentración de 8,75 mg/kg y C por una concentración de 18,75 mg/kg. La determinación de la concentración de Sn se realiza por duplicado razón por cual se generan dos líneas, una línea negra y otra azul, las cuales se aprecian superpuestas debido a la poca variación entre las determinaciones. Adicionalmente, se presenta una línea roja que representa el cambio en la temperatura que se mencionó en el Cuadro 1. El aumento en la concentración de Sn genera un aumento en las UA. Se utilizó el software SpectrAA versión 5.4 PRO

La selectividad del método se refiere a su capacidad de identificar el elemento de interés en presencia de otros elementos o interferencias que podrían afectar la determinación; en la Figura 3 se evidencia que el método cumple con este parámetro ya que tiene la capacidad de dar respuesta en UA de acuerdo con la concentración de Sn presente en cada muestra.

Tanto la selectividad como la especificidad del método están relacionadas con aspectos como los componentes que conforman el equipo de espectroscopía de absorción atómica, ya que estos permiten seleccionar la longitud de onda característica del elemento a determinar, lo que garantiza que la señal producida sea de dicho elemento (Gallego et al., 2015; González, 2010a). Además, la utilización de corrección de fondo por efecto Zeeman permite eliminar las interferencias espectrales durante la determinación del analito (Mañay et al., 2009). Los aspectos mencionados permiten asegurar que la respuesta dada depende únicamente de la ausencia o presencia del analito de interés.

4.2.9 Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre se realizó con base en los valores de coeficiente de variación establecidos en el apartado de precisión intermedia o reproducibilidad. Debido a la variabilidad en los resultados obtenidos en el coeficiente de variación a los diferentes niveles de concentración de Sn, se agrupó el cálculo de la incertidumbre según se muestra en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Determinación de la incertidumbre según los niveles de concentración de Sn sobre matriz

Nivel de concentración	Cálculo de la incertidumbre
LC ≤ 15 mg/kg	$U_{exp} = \text{Concentración en mg/kg} \times 0,066 \times 2$
> 15 mg/kg a 200 mg/kg	$U_{exp} = \text{Concentración en mg/kg} \times 0,042 \times 2$
> 200 mg/kg a ≤ 300 mg/kg	$U_{exp} = \text{Concentración en mg/kg} \times 0,097 \times 2$

U_{exp} = incertidumbre expandida Conc. = concentración de Sn

4.3 Resultados de análisis de estaño en muestras de interés comercial

La determinación de Sn se realizó por duplicado según lo establecido en el procedimiento de análisis de metales pesados del LANASEVE. Se analizaron cinco muestras de cada una de las matrices de interés, atún en agua, atún en aceite, sardina en aceite y sardina en salsa de tomate, para un total de 20 muestras analizadas. Para realizar la determinación de Sn en muestras de atún se utilizó una curva de calibración preparada en extracto de atún; las muestras de sardina fueron analizadas utilizando una curva de calibración preparada en extracto de sardina, lo anterior según lo establecido en el punto 4.2.2. En el Cuadro 17 se presentan los resultados obtenidos para la totalidad de las muestras analizadas, los cuales son inferiores al LD establecido en la determinación de los parámetros de desempeño del método que es de 0,6 mg/kg de Sn. Adicionalmente, al comparar los resultados con el LMP de 200 mg/kg, establecido en la normativa de referencia (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2008) se puede indicar que estos son conformes. En el Anexo 10 se detallan los resultados obtenidos para las 20 muestras analizadas por duplicado.

Cuadro 17. Resultados de muestras de interés comercial analizadas para la determinación de Sn

Matriz	Fecha de recepción	Muestra	Resultado
Atún en agua	20 de mayo de 2020	1	ND
		2	
		3	
		4	
		5	
Atún en aceite	20 de mayo de 2020	1	ND
		2	
		3	
		4	
		5	
Sardina en aceite	20 de mayo de 2020	1	ND
		2	
		3	
		4	
		5	
Sardina en salsa de tomate	20 de mayo de 2020	1	ND
		2	
		3	
		4	
		5	

ND= No detectado

Un estudio en el que también se determinó la concentración de Sn en sardinas enlatadas, específicamente comercializadas en Brasil, fue el presentado por Tarley et al. (2001), en el cual se obtuvieron resultados cuantificables entre $(2,07 \pm 0,35)$ mg/kg y $(4,57 \pm 0,47)$ mg/kg, que, a pesar de ser menores al LMP de 200 mg/kg, superan los resultados obtenidos en muestras comercializadas en Costa Rica, que fueron inferiores a 0,6 mg/kg, lo que corresponde al LD del método.

Por otra parte, al analizar los resultados obtenidos en el estudio realizado en muestras de pescado enlatado en Georgia y Alabama, Estados Unidos (Ikem & Egiebor, 2005); se encuentra mayor similitud con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que el promedio de la concentración de Sn en muestras de atún fue de 0,33 mg/kg y en muestras de sardina fue de 0,43 mg/kg, concentraciones que se encuentran por debajo del LD definido en

esta investigación. Además, las concentraciones de Sn obtenidas se encuentran por debajo del límite máximo permitido.

Es importante destacar que a pesar de que estudios a nivel internacional y los resultados que se presentan en esta investigación cumplen con el límite máximo permitido, es necesario monitorear la concentración de Sn en productos enlatados, con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos de origen animal y cumplir con los requisitos en materia de legislación.

5. Conclusiones

- Se optimizaron las condiciones del espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito y del digestor microondas con los que cuenta el LANASEVE del SENASA, para la determinación de estaño en atún y sardinas enlatados.
- La evidencia obtenida en la evaluación de los parámetros de desempeño: linealidad y ámbito de trabajo; efecto matriz, exactitud: precisión (instrumental e intermedia) y veracidad; límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, selectividad, especificidad y estimación de incertidumbre; permitieron concluir que el método para la determinación de estaño por espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito es apto para el análisis de muestras de atún en agua y atún en aceite.
- Las muestras de atún deben ser leídas en curva de calibración preparada en extracto de atún.
- El parámetro de veracidad para sardinas en aceite y sardinas en salsa de tomate a concentraciones de Sn de 100 mg/kg o mayores, no cumplió con el criterio de aceptación establecido en la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea y en el Reglamento CAC/GL 71-2009 del CODEX, lo que implica que el LANASEVE no puede utilizar la metodología desarrollada en este estudio, para dichas matrices.
- El contar con una metodología para la determinación de estaño en muestras de atún enlatado, permite al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios ofrecer un nuevo servicio, lo cual reduce los costos del traslado de las muestras que se envían para análisis fuera del país.
- Las 20 muestras de interés comercial analizadas mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito, distribuidas en cinco muestras de cada una de las siguientes matrices: atún en agua,

atún en aceite, sardina en aceite y sardina en salsa de tomate; presentaron niveles de estaño inferiores al límite de detección determinado que corresponde a 0,6 mg/kg, por lo que los resultados se interpretaron como No Detectados.

6. Recomendaciones

- Realizar análisis adicionales que permitan ampliar la aplicación del método desarrollado para sardina enlatada y, de no ser posible, considerar la utilización de otra técnica analítica que permita la determinación de Sn a niveles cercanos al LMP.
- La determinación del LD y LC se realizó utilizando blancos matriz de sardina en salsa de tomate debido a que se obtenían los valores más pesimistas, sin embargo, se aconseja repetir la determinación de estos parámetros de desempeño empleando blancos matriz de atún, al ser la matriz para la que se declaró apto el método.

7. Referencias

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., & Barberis, R. (2002). Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental Pollution*, 119(2), 177–193.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2005). *Resumen de salud pública Estaño y Compuestos de Estaño*.
- Amorós, M., & Barrero, L. (2016). Análisis bioquímico. In *Editorial Síntesis*, S. A.
- Arispe, I., & Tapia, M. S. (2007). Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria*, 13, 105–117.
- Asamblea Legislativa de Costa Rica. (2006). *Ley 8495 General del Servicio Nacional de Salud Animal SENASA* (p. 28). Diario Oficial la Gaceta.
- Azeh Engwa, G., Udoka Ferdinand, P., Nweke Nwalo, F., & N. Unachukwu, M. (2019). Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. *IntechOpen*, June.
- Claramunt, R. M., Comago, P., Esteban, S., Farrán, A., Pérez, M., & Sanz del Castillo, D. (2013). *Principales compuestos químicos*.
- Codex Alimentarius. (1995). Norma General del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. *Codex Stan 193_1995*, 1–48.
- Codex Alimentarius. (2009). *Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos CAC/GL 71-2009*.
- Combariza, A. (2009). *Contaminación por metales pesados en el embalse del Muña y su relación con los niveles en sangre de plomo, mercurio y cadmio y alteraciones en salud de los habitantes del municipio de Sibaté (Cundinamarca) 2007*. Universidad Nacional de Colombia.
- Comité sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, & CODEX. (2003). *Documento de examen sobre el estaño*.
- Corrales, A. (2016). *Propuesta de un plan de mercadeo para la comercialización de la marca de atún enlatado Tuny para la empresa Sinax Centroamericana S. A. en el Gran Área Metropolitana*. Universidad de Costa Rica.
- DIPOA. (2020). *Producción de producto pesquero enlatado en Costa Rica*.
- Diviš, P., Štávová, E., Pořízka, J., & Drábiková, J. (2017). Determination of tin, chromium, cadmium and lead in canned fruits from the Czech market.

Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 11(1), 564–570.

- Domínguez, E., & Ferrer, J. (2011). *Metales y aleaciones (Mecanizado básico)*. (Editex, S.).
- Duffus, J. H. (2002). "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793–807.
- Espinoza, E. R., & Alvarado, A. L. (2012). Desarrollo y validación de un método voltamperométrico para determinar estaño total en agua. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 28(1), 61–72.
- FAO-WHO. (2020). *Codex Alimentarius Normas Internacionales de los Alimentos*.
- Fuentes, X., Castiñeiras, M., & Queraltó, J. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular* (Reverté, S).
- Gallego, A., Garcinuño, R., & Morcillo, M. (2015). *Experimentación en química analítica*.
- Gallegos, W.; Vega, M.; Noriega, P. (2012). Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. *La Granja. Revistas de Ciencias de La Vida*, 15(1), 18–25.
- García, I., & Dorronsoro, C. (2005). *Contaminación por Metales Pesados. En Tecnología de Suelos*.
- Gil, Á., Martín-Lagos, R., & Ruiz, M. D. (2005). *Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (Editorial).
- Gomis, V. (2008). *Espectroscopia de emisión y absorción atómica*.
- González, A. (2010a). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular* (Elsevier).
- González, A. (2010b). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular* (Elsevier).
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (Reverté, S).
- Hernández, L., & González, C. (2002). *Introducción al análisis instrumental*.
- Hosseini, S. V, Aflaki, F., Sobhanardakani, S., Tayebi, L., Babakhani, A., & Regenstein, J. M. (2013). *Analysis of mercury , selenium , and tin concentrations in canned fish marketed in Iran*. 185, 6407–6412.
- Ikem, A., & Egiebor, N. O. (2005). Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8), 771–787.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos, I. (2012). *Estadísticas de Comercio Exterior 2012* (Vol. 2, pp. 1–7).

- Kastenmayer, P. (1997). Análisis de minerales y elementos traza en alimentos. In *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición* (pp. 271–294).
- La Comisión de las Comunidades Europeas. (2002). *2002/657/CE: Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002*. 3, 8–36.
- La Comisión de las Comunidades Europeas. (2006). Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006. In *Diario Oficial de la Unión Europea* (pp. 5–24). Diario Oficial de la Unión Europea.
- La Comisión de las Comunidades Europeas. (2007). *Reglamento (CE) No 333/2007 de la Comisión de 28 de marzo de 2007* (pp. 29–38). Diario Oficial de la Unión Europea.
- Reglamento (UE) N° 836/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011 p. 9 (2011).
- Linsinger, T. (2005). *Application Note 1. Comparación del resultado de una medida con el valor certificado*.
- Lobaina, D. (2020). *Informe de productos pesqueros enlatados importados durante el 2018*.
- MAG-MEIC-COMEX. (2010). *Política Nacional de Inocuidad de los Alimentos* (pp. 1–6).
- Manahan, S. (2007). *Manahan, S.* (Editorial).
- Mañay, N., Clavijo, G., & Díaz, L. (2009). Absorción atómica con horno de grafito. In S. Litter, M.; Armienta, M. y Farias (Ed.), *Metodologías Analíticas para la determinación y especiación de As en aguas y suelos* (CYTED, pp. 79–92).
- Mazorriaga, A., Doménech, R., & Mayordomo, T. (2016). *Preelaboración y conservación de pescados, crustáceos y moluscos. UF0064*. (Editorial).
- Mendoza, B., Almao, L., Marcó Parra, L. M., & Rodríguez, V. (2014). Evaluación de dos métodos de digestión ácida en el análisis de tejido foliar de caña (*Saccharum officinarum* L.). *Ciencia y Tecnología*, 7(2), 9–20. <https://doi.org/10.18779/cyt.v7i2.98>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2008). *Reglamento límites máximos contaminantes productos de la pesca para consumo humano*. Diario Oficial la Gaceta.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, A. y M. A. (2007). *Compuestos organoestánicos (Sn total)*. Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes.
- Mol, S. (2011). *Levels of Heavy Metals in Canned Bonito , Sardines , and Mackerel Produced in Turkey*. 200, 974–982.
- Morais, S., Garcia e Costa, F., & Pereira, M. de L. (2012). Heavy Metals and

- Human Health. *Environmental Health - Emerging Issues and Practice*, February.
- Nava-Ruiz, C., & Méndez-Armenta, M. (2011). *Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio)*. 16(3), 140–147.
- Nordberg, G. (2013). Metales: propiedades químicas y toxicidad. In *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*.
- Oficina Comercial de Chile en Costa Rica, P. (2016). *Estudio de mercado pescados, moluscos y crustáceos en conserva en Costa Rica* (pp. 1–16).
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2002). Reglamento (CE) Nº 178/2002. In *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.
- Pazos, P. (2007). *Biodisponibilidad de Cromo en sedimentos marinos de la Ría de Arousa*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Pérez, E., & Barrantes, C. (2017). Evaluación de tres métodos para la recuperación de metales pesados en fertilizantes. *UNED Research Journal*, 9(2), 257–265.
- Pérez, F., & Zamora, S. (2002). *Nutrición y alimentación humana* (Aula de Ma).
- Pineda, R. (2004). *Presencia de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Contribución de Glomus Intraradices en la Absorción y Translocación de Zinc y Cobre en Girasol (Helianthus Annuus L.) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina*. Universidad de Colima.
- Reglamento de límites máximos microbiológicos y de residuos de medicamentos y contaminantes para los productos de la pesca y de la acuicultura destinados para consumo humano, (2008).
- Ramos, J. (2002). *Estudio de la contaminación por metales pesados y otros procesos de degradación química en los suelos en los invernaderos del poniente almeriense* [Universidad de Almería].
- Razmilic, B. (1989). Espectroscopía de absorción atómica. *Merck Química Chilena Soc. Ltda.*, 10(2), 74–76.
- Reyes, J., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77.
- Rocha, F. R. P., & Teixeira, L. S. G. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, 27(5), 807–812.
- Rodríguez-Heredia, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *Medisan*, 21(12), 3372–3385.
- Rodríguez, R. (1999). *Aportaciones al conocimiento del estado medioambiental de hidrosistemas de interés internacional situados en Castilla-La Mancha*

[Universidad de Castilla-La Mancha].

- Santiago, R. (2007). *Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón* [Universidad de Santiago de Compostela]. <https://goo.gl/rpokKv>
- SENASA, D. G. (2016). *Medidas de control ante resultados No Conformes*.
- Serra, L., & Aranceta, J. (2006). *Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones* (Elsevier).
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (McGraw-Hill).
- Tafur, M. allister. (2009). La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(3), 330–338.
- Tarley, C. R. T., Coltro, W. K. T., Matsushita, M., & De Souza, N. E. (2001). Characteristic levels of some heavy metals from Brazilian canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(6), 611–617.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metals toxicity and the environment. *National Institutes of Health Public Access*, 101, 133–164.
- Thomann, R. (1984). No Title. *Ecological Modelling*, 6(22), 145–170.
- Vázquez, C., de Cos, A., & López, C. (Eds.). (2005). *Alimentación y nutrición: manual teórico y práctico* (Díaz de Sa).
- Villegas, W., Acereto, P., & Vargas, M. (2006). *Análisis ultravioleta-visible: la teoría y la práctica en el ejercicio profesional* (Ediciones).
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93–104.
- Walton, H., & Reyes, J. (1983). *Análisis químico e instrumental moderno*.

8. Anexos

Anexo 1

Coefficientes de calibración obtenidos para las curvas de calibración de Sn preparadas en HNO₃ 2% y en extracto de las matrices de estudio para la caracterización de la linealidad del método de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.

Curva	HNO ₃	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate
1	0,9998	0,9993	0,9994	0,9998	0,9998
2	0,9997	0,9995	0,9993	0,9998	0,9998
3	0,9997	0,9997	0,9995	0,9983	0,9998
4	1,0000	0,9996	0,9995	0,9986	0,9978
5	0,9981	0,9993	0,9994	0,9996	0,9994
6	0,9991	0,9978	0,9967	0,9990	0,9993
R² promedio	0,9994	0,9992	0,9990	0,9992	0,9993

Anexo 2

Comparación de los coeficientes de determinación obtenidos para las curvas de calibración elaboradas en HNO₃ 2 % y en extracto de las matrices de interés, mediante el análisis de varianza ANOVA empleando el programa estadístico Minitab versión 18 y aplicación de las pruebas de Tukey y Fisher, a un 95 % de confianza.

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 5 HNO₃; Atún agua; Atún aceite; Sardina aceite; Sardina tomate

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0,000001	0,000000	0,25	0,908
Error	25	0,000016	0,000001		
Total	29	0,000017			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0008062	3,82%	0,00%	0,00%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
HNO3	6	0,999400	0,000704	(0,998722; 1,000078)
Atún agua	6	0,999200	0,000704	(0,998522; 0,999878)
Atún aceite	6	0,998967	0,001113	(0,998289; 0,999645)
Sardina aceite	6	0,999183	0,000646	(0,998505; 0,999861)
Sardina tomate	6	0,999317	0,000776	(0,998639; 0,999995)

Desv.Est. agrupada = 0,000806226

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
HNO3	6	0,999400	A
Sardina tomate	6	0,999317	A
Atún agua	6	0,999200	A
Sardina aceite	6	0,999183	A
Atún aceite	6	0,998967	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
HNO ₃	6	0,999400	A
Sardina tomate	6	0,999317	A
Atún agua	6	0,999200	A
Sardina aceite	6	0,999183	A
Atún aceite	6	0,998967	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

Anexo 3

Porcentajes de recuperación obtenidos al leer muestras de las matrices de interés fortificadas con Sn, sobre curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y en extracto de las mismas matrices, utilizados para determinar el efecto matriz.

Atún agua

	HNO ₃	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate
	93,8	98,9	100,6	116,8	
	93,5	91,5	103,1	120,2	117,7
	90,2	96,5	131,8	151,5	119,2
	93,9	97,2	132,5	157,1	118,8
	88,1	101,9	97,7	122,2	107,7
	93,9	104,1	95,9	119,2	116,1
Porcentaje de recuperación promedio	92,2	98,4	110,3	131,2	115,9

Atún aceite

	HNO ₃	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate
	101,8	104	103,7	126,6	
	103,6	103,3	106	129	126,5
	94,4	103,3	111,2	155,5	126,1
	96,3	99,2	110,6	154,8	124,8
	94,5	102,6	92,8	116,5	113
	93,8	92,8	94,9	114,7	112,8
Porcentaje de recuperación promedio	97,4	100,9	103,2	132,9	120,6

Sardina aceite

	HNO ₃	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate
	88,9	82,8	83,5	98,8	
	88,5	82,4	85,7	103,3	106,6
	70,3	71,4	99,3	110,3	87,8
	73,5	74,6	98,9	111	91,9
	68,5	65,5	69	83	79,8
	75,7	73	77,6	95,9	84,5
Porcentaje de recuperación promedio	77,6	75,0	85,7	100,4	90,1

Sardina tomate

	HNO ₃	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate
	83,9	76,4	86,2	96,5	
	86	84,2	87,6	99,6	102,5
	78	83,2	104,8	122,9	100,2
	73,2	77,8	100,1	117,2	98,1
	79,8	78,1	79,6	98,7	88,6
	73	68,8	70,2	88,1	79,5
Porcentaje de recuperación promedio	79,0	78,1	88,1	103,8	93,8

Anexo 4

Porcentajes de recuperación promedio de Sn al fortificar muestras de cada una de las matrices de interés a los diferentes niveles de concentración.

Niveles de concentración de Sn en matriz (mg/kg)	Atún agua	Atún aceite	Sardina aceite	Sardina tomate	Porcentaje de recuperación promedio
1,8	99	95	94	95	96
8,75	99	95	106	102	100
18,75	93	87	95	95	92
100	89	93	146	140	117
200	90	88	142	151	118
300	89	105	142	156	123

Anexo 5

Determinación de la precisión instrumental al analizar la dispersión de 6 réplicas de dos disoluciones de Sn.

Concentración teórica 15 µg/L

Concentración teórica 30 µg/L

Repetición	Concentración obtenida (µg/L)
1	15,9
2	16,2
3	15,0
4	15,9
5	14,4
6	15,0
Desvest	0,7
Promedio	15,4
C.V.	4,5

Repetición	Concentración obtenida (µg/L)
1	29,3
2	28,7
3	28,8
4	29,3
5	28,2
6	29,7
Desvest	0,5
Promedio	29,0
C.V.	1,9

Anexo 6

Cálculos para la determinación de la presión intermedia, según lo detallado en el apartado 3.2.3.2 del marco metodológico.

Horwitz

Conc. ug/kg	C	RSD _R %	HORRAT _R
1880,0000	1,88E-06	14,5	0,49
8750,0000	8,75E-06	11,5	0,56
18750,0000	1,88E-05	10,2	0,61
100000,0000	1,00E-04	8,0	0,43
200000,0000	2,00E-04	7,2	0,70
300000,0000	3,00E-04	6,8	1,44

Conc. (mg/kg) Sn sobre matriz	% recuperación promedio	Desvest	C.V.	HORRAT _R	Criterio de aceptación HORRAT _R < 2
1,88	96,10	6,78	7,05	0,48	Cumple
8,75	100,40	6,49	6,47	0,55	Cumple
18,75	92,38	5,79	6,26	0,59	Cumple
100	90,51	3,13	3,46	0,43	Cumple
200	88,80	4,44	5,00	0,70	Cumple
300	96,70	9,41	9,73	1,44	Cumple

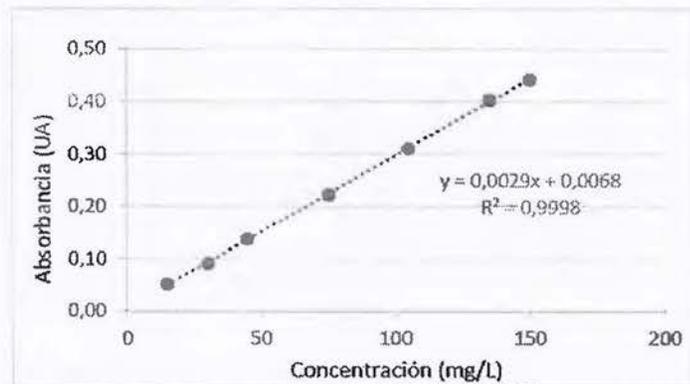
Anexo 7

Cálculos para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación

Lectura	Absorbancia
1	0,0061
2	0,0071
3	0,0082
4	0,0057
5	0,0146
6	0,0177
7	0,0116
8	0,0052
9	0,0062
10	0,0077
11	0,0097

12	0,0069
13	0,0057
14	0,0100
15	0,0099
16	0,0110
17	0,0152
18	0,0112
19	0,0171
20	0,0069
Promedio	0,0097
Desvest	0,0039
LD señal	0,0213
LC señal	0,0485

Concentración (µg/L)	Absorbancia (UA)
15	0,0526
30	0,0926
45	0,1393
75	0,2232
105	0,3113
135	0,4038
150	0,4435
Coefficiente de determinación:	0,9997



Parámetro	Resultado	Concentración (mg/kg)
LD	5,0	0,6
LC	14,4	1,8

Anexo 8

Evaluación del LD y del LC al realizar la fortificación de muestras de sardina en salsa de tomate a las concentraciones definidas para dichos límites.

Muestra control	Porcentaje de recuperación	
	LD	LC
1	98,2	92,3
2	96,6	96,5
3	104,3	91,0
4	85,2	95,5
5	82,1	92,8
Porcentaje de recuperación promedio	93,28	93,62

Anexo 9

Pendientes de la ecuación de 6 curvas de calibración preparadas en HNO₃ 2 % y 6 curvas de calibración preparadas en extracto de cada una de las matrices de estudio, utilizadas para la determinación de la sensibilidad del método de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para la determinación de Sn en muestras de sardina y atún enlatados.

Curva de calibración	Pendiente				
	HNO ₃	Atún agua	Atún aceite	Sardina Aceite	Sardina Tomate
1	0,0028	0,0040	0,0040	0,0030	0,0029
2	0,0034	0,0041	0,0038	0,0022	0,0031
3	0,0037	0,0038	0,0039	0,0028	0,0024
4	0,0036	0,0035	0,0037	0,0022	0,0030
5	0,0028	0,0030	0,0033	0,0029	0,0025
6	0,0029	0,0035	0,0034	0,0024	0,0025
Pendiente promedio	0,0032	0,0037	0,0037	0,0026	0,0027

Anexo 10

Resultados obtenidos de la concentración de Sn en muestras de atún y sardina de interés comercial en Costa Rica.

Matriz	Réplica	Concentración Sn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Atún agua	1/1	379,45
	1/2	439,92
	2/1	359,84
	2/2	397,19
	3/1	396,63
	3/2	389,83
	4/1	465,45
	4/2	367,21
	5/1	589,94
	5/2	448,67
Atún aceite	1/1	505,64
	1/2	534,50
	2/1	154,33
	2/2	161,21
	3/1	117,82
	3/2	102,52
	4/1	102,67
	4/2	114,03
	5/1	106,34
	5/2	98,02

Matriz	Réplica	Concentración Sn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Sardina aceite	1/1	554,17
	1/2	556,55
	2/1	403,90
	2/2	356,93
	3/1	593,62
	3/2	562,63
	4/1	354,99
	4/2	362,48
	5/1	401,46
	5/2	325,40
Sardina tomate	1/1	490,00
	1/2	532,53
	2/1	492,98
	2/2	515,41
	3/1	418,03
	3/2	387,75
	4/1	502,64
	4/2	577,41
	5/1	361,84
	5/2	401,76