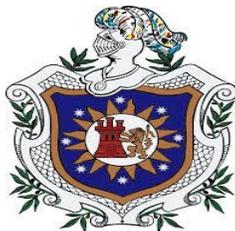


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN- LEÓN



Facultad de Ciencias y Tecnología

Departamento de Química

“Evaluación de parámetros para la validación del método para la determinación de metabisulfito de sodio por yodimetría en muestras de camarón”

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Químico en el grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

- **Br. Leonardo Antonio Reyes Venerio**
- **Br. Jeffrey Alexander Parrales Salinas**
 - **Br. Ruth Sandino Montes**

Tutor: Msc. Fabio José Pallaviccini Narváez

León, Nicaragua Noviembre 2016

RESUMEN

La presente investigación científica se basa en la evaluación de parámetros para la validación de un método para la determinación de metabisulfito de sodio (MBS) por yodimetría en muestras de camarones, este metabisulfito se aplica en aguas de cultivo de camarones tanto de cosecha marítima como en granjas productoras de camarón para inhibir la formación de melanosis. Es debido a este tratamiento de MBS que es necesario controlar el contenido de MBS en camarones. El método utilizado es el método yodimétrico. Se evaluaron algunos parámetros de validación tales como: Linealidad, Precisión, Exactitud, límite de Detección y Cuantificación. Entre los resultados obtenidos tenemos que para la evaluación de la linealidad se calculó su coeficiente de determinación el cual fue 0.9994; La precisión se determinó mediante los coeficientes de variación. La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación el cual se obtuvo 98.82%. Para los límites de detección y cuantificación estos se calcularon mediante los parámetros de regresión evaluados en la linealidad obteniéndose valores de 0.02ppm y 0.06ppm de MBS respectivamente. Por último se aplicó el método a seis muestras de camarón donde se encontraron valores de MBS menores de 100ppm.

ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS	6
II. INTRODUCCIÓN	7
III. OBJETIVOS	8
III.1 Objetivo general	8
III.2 Objetivos Específicos	8
IV. JUSTIFICACIÓN	9
V. MARCO TEÓRICO	10
V.1 Nicaragua segundo productor de camarón en la región	10
V.2 La melanosis en camarones enteros y como prevenir su desarrollo..	11
V.3 Yodimetría	14
V.3.1 Métodos yodimétricos	14
V.3.2 Punto Final	14
V.3.3 Determinaciones Yodimétricas	15
V.4 Sulfitos como conservante y su control en los alimentos	16
V.5 Validación de métodos	18
V.5.1 Definición	18
V.5.2 Parámetros para la validación	20
V.5.2.1 Linealidad	20
V.5.2.2 Precisión (Condiciones de repetibilidad y precisión intermedia)	20
V.5.2.3 Límite de detección y cuantificación	21
V.5.2.4 Exactitud	21
V.5.2.5 Recuperación	22
V.5.2.6 Medición de la incertidumbre	22
V.5.3 Supervisión y control del funcionamiento del método.	23

VI. PARTE EXPERIMENTAL	24
VI.1 Equipos y Materiales	24
VI.1.1 Equipo involucrado:	24
VI.1.2 Materiales	24
VI.2 Reactivos	24
VI.3 Procedimiento	25
VI.3.1 Preparación de Soluciones	25
VI.3.2 Tratamiento de la Muestra	27
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	28
VII.1 LINEALIDAD	28
VII.1.1 Coeficiente de determinación y comportamiento de la gráfica	29
VII.1.2 Gráfico de Residuales	30
VII.1.3 Test de linealidad	31
VII.2 PRECISIÓN	32
VII.2.1 Repetibilidad de muestra	32
VII.2.2 Precisión Intermedia de la muestra	33
VII.2.3 Repetibilidad del estándar a 70ppm	34
VII.2.4 Precisión intermedia del estándar a 70ppm	35
VII.3 EXACTITUD	36
VII.3.1 Recuperación o recobro	36
VII.4 LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION	38
VII.5 Criterio de Aceptación de Parámetros de Validación.	39
VIII. APLICACIONES DEL METODO	40
IX. CONCLUSIONES	42
X. RECOMENDACIONES	44

XI. BIBLIOGRAFIA..... 45

I. AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos salud y sabiduría en el transcurso de la investigación.

A nuestros padres, por el amor y apoyo que nos han brindado para llegar a ser lo que somos.

A nuestro tutor, Msc. Fabio Pallavicini, por brindarnos todos sus conocimientos y ser muy paciente.

A la universidad nacional autónoma de Nicaragua UNAN- León por brindarnos su apoyo incondicional al facilitarnos algunos materiales que fueron de mucha importancia al momento de realizar este proyecto.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADOR

A la empresa camaronera Sahlman Seafoods of Nicaragua S.A, por habernos autorizado la realización de dicho proyecto, habiendo así facilitado el acceso a trabajar dentro de su laboratorio de control de calidad, llevando a cabo los análisis químicos para esta investigación, permitiéndonos el uso de aparatos, materiales y reactivos, y por habernos facilitado viáticos de alimentos durante el tiempo que estuvimos laborando en sus instalaciones.

II. INTRODUCCIÓN

El Camarón es uno de los mariscos de mayor aceptación en el mercado internacional por sus atributos organolépticos, es muy apetecido en las comidas, esto contribuye a que exista una buena producción del mismo en las granjas acuícolas donde la calidad del camarón es esencial para mantener su valor. La baja calidad no solo reduce su valor económico, sino que también daña la reputación de la granja procesadora. La adición de antioxidantes como sulfitos previene la aparición de manchas negras tanto en la cabeza como en la cola esta enfermedad es denominada (melanosis). [6]

La cantidad de sulfitos en camarones no debe exceder de 150 ppm ya que puede causar daños en la salud de las personas, es por eso que se debe determinar la cantidad de sulfito y una de las maneras de determinarlo es por el método yodimétricos. Los métodos yodimétricos son métodos directos de análisis que utiliza como reactivo valorante una solución de yodo. [6]

Debido a la importancia de brindar resultados confiables de sulfito presente en camarones es necesario realizar la validación del método para confirmar que el procedimiento analítico utilizado es adecuado para el uso previsto. Los resultados de la validación del método pueden utilizarse para juzgar la calidad, la fiabilidad y la constancia de los resultados analíticos, tratándose de una parte integrante de cualquier buena práctica analítica. [7]

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

- Validar el método para la determinación de metabisulfito de sodio (MBS) por yodimetría en muestras de camarón.

III.2 Objetivos Específicos

- Evaluar parámetros de desempeño tales como: Linealidad, Repetibilidad, Precisión intermedia Limite de detección, Limite de cuantificación, Exactitud.
- Aplicar el método validado a muestras de camarón obtenidas de la empresa Sahlman Seafoods of Nicaragua S.A.

IV. JUSTIFICACIÓN

En Nicaragua el camarón blanco (*penaeus vannamei*) permanece como uno de los mariscos más populares y de mayor valor en el mercado mundial. Con esto, la producción de camarón no es solo una de las industrias más grandes, sino una de las más lucrativas. [8]

La calidad del camarón es esencial para mantener su valor. La baja calidad no solo reduce su valor económico, sino que también daña la reputación de la granja, planta procesadora o país. [8]

Los problemas relacionados con su inocuidad son raros, pero pueden producirse enfermedades significativas y causar daños costosos a la industria. [8]

Los sulfitos usados para prevenir la melanosis del camarón pueden causar una reacción alérgica a ciertos consumidores particularmente las personas asmáticas extremadamente sensibles que podrían tener reacciones severas respiratorias y alérgicas que podrían arriesgar sus vidas es por ello que deben ser controlados estos niveles de dióxido de azufre. [8]

El presente trabajo trata de la evaluación de los parámetros de validación para el método de determinación de metabisulfito de sodio en camarón por yodimetría, que es uno de los métodos más utilizados en las industrias camaroneras. [6]

Es por ello que se necesita conocer el cumplimiento de los parámetros de desempeño de dicho método analítico, para el análisis de las muestras de camarón y así obtener resultados más exactos y precisos que garanticen la credibilidad de las mediciones. [7]

V. MARCO TEÓRICO

V.1 Nicaragua segundo productor de camarón en la región

La producción de camarón de cultivo nicaragüense, en 2013, fue de 24,500 toneladas métricas, las cuales aportaron al país ingresos por US\$ 150, 000,000 según la CEPAL (comisión económica para américa latina y el caribe). Nicaragua es el segundo país de la región centroamericana con las mayores producciones de camarón de cultivo, solo superado por honduras, según el estudio fortalecimientos de la Cadena de Valor como instrumento de la política industrial, publicado el 3 de junio del 2014 por la comisión económica para américa latina y el caribe CEPAL. [8]

De acuerdo con la CEPAL, en el 2013 la producción de camarón de cultivo de Nicaragua fue de 24,500 toneladas métricas, las cuales aportaron al país ingresos por US\$ 150 millones. Por su parte, en Honduras, el volumen de producción ascendió a pocas más de 30 mil toneladas métricas, que fue el cuarto rubro generador de divisas en su economía, con US\$ 204.7 millones. [8]

El tercer mayor productor de este rubro en la región según la CEPAL es Guatemala, con 17 mil toneladas métricas, que aportaron ingresos por más de US\$ 80 millones. [8]

El camarón es uno de los productos primarios de mayor crecimiento en los mercados nacionales e internacionales por su valor comercial y demanda sostenida, señala el estudio de la CEPAL. [8]

El organismo internacional indica que en el período 2000-2010, la región produjo 650, 475 toneladas métricas de camarón de cultivo, de las cuales 112,322 fueron producidas en Nicaragua. Así, el país alcanzó una participación del 17.2%, muy atrás de Honduras que tuvo una aportación del 39.7%, con sus 258,475 toneladas métricas producidas. [8]

En el 2013, el camarón de cultivo fue la actividad que impulsó el crecimiento de la pesca en Nicaragua, seguido por la langosta y los pescados. [8]

Con la mejor evolución

El camarón de cultivo es uno de los pocos productos de exportación de Nicaragua que registran buenos resultados en sus ventas externas en sus últimos años a tal punto que en el 2007 sus ventas sumaron US\$37.3 millones, US\$ 74.1 millones en 2010 y US\$ 150 millones en 2013. [8]

Entre 2012-2013, la producción de camarón de cultivo en Nicaragua experimentó un crecimiento del 7% y este aumento se debió a la aplicación de nuevas tecnologías. [8]

Nuestros métodos de siembra están basados en la aplicación de sistemas de oxigenación de aguas y en las aplicaciones de laboratorio que generan mayores rendimientos. La producción de camarón de cultivo en Nicaragua tuvo un crecimiento del 7% en el período de 2012-2013. [8]

V.2 La melanosis en camarones enteros y como prevenir su desarrollo

La melanosis es referida a una coloración negruzca causada por la enzima polifenol oxidasa (tirosinasa). Esta enzima reacciona con el contenido celular del camarón para formar pigmentos. La melanosis es considerada el principal problema en la industria del camarón entero. Se desarrolla a las pocas horas de la muerte del camarón, comenzando en la cabeza del camarón y ramificándose atreves de la cola. [6]

El metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) provee un efectivo control en el desarrollo de la melanosis. La comunidad económica europea (CCE) acepta hasta 150 ppm de residuos de sulfitos para camarones enteros tratados con MBS. [6]

La presentación del camarón entero como producto, constituye una fuente potencial de problema en el control de calidad. La mayoría de los órganos y enzimas digestivas se encuentran en la región del cefalotórax del camarón, estos órganos son los primeros en descomponerse al morir y su congelamiento no prolongará sustancialmente la prevención del deterioro en la calidad del camarón. [6]

El mercado internacional exige un camarón con carne de consistencia firme y con un exoesqueleto rígido. Además, el sabor del hepatopáncreas es importante para los compradores europeos. Para ofrecer un producto de alta calidad el hepatopáncreas del camarón debe tener un sabor a marisco y no amargo. Los europeos son muy exigentes en cuanto a la apariencia del camarón y castigan fuertemente el camarón en presencia de “melanosis” (Black Spot). El término melanosis se refiere a una coloración negruzca causada por la enzima polifenol oxidasa (tirosinasa). La enzima reacciona con el contenido celular formando pigmentos insolubles. Los pigmentos se desarrollan principalmente en un medio alcalino. [6]

La melanosis resulta en un problema de apariencia, análoga al oscurecimiento de manzanas y papas. El proceso bioquímico se asemeja al broncearse la piel humana cuando es expuesta por periodos prolongados de tiempo a la luz solar (Slattery et al., 1992). La melanosis reduce el valor comercial y la aceptación del producto (Wigglesworth, 1995). Las normas oficiales de los Estados Unidos consideran a la melanosis como una mancha, no como una alteración. Esta diferencia es de gran importancia económica. [6]

El productor de camarón entero queda exento de responsabilidades sanitarias ya que la melanosis es considerada como un fenómeno natural del camarón. [6]

Uno de los métodos más sencillos para la prevención de melanosis es el descabezado ya que la mayoría de la enzima causante del oscurecimiento está ubicada en la zona del cefalotórax del camarón. Las altas temperaturas alcanzadas al cocinar los camarones inactiva la enzima que causa melanosis. El ácido bórico evita melanosis pero su uso fue prohibido por la organización mundial de la salud (OMS) por tener efectos negativos al cerebro especialmente en niños (López, 1990). Los sulfitos han sido usados por la industria pesquera desde los años 50 para prevenir melanosis. [6]

El dióxido de azufre y sus derivados han sido utilizados en alimentos como conservantes generales. Inhiben y controlan microorganismos y son usados como antioxidantes y agentes reductores. Igualmente, los sulfitos inhiben la enzima

responsable de desarrollar la melanosis, que es el problema con mayor importancia en la industria del camarón entero. [6]

Las formas de sulfito más comúnmente utilizadas en alimentos incluyen el gas de dióxido de sulfuro (SO_2), sales de sulfito (SO_2^{-2}), bisulfito (HSO_3^-) o metabisulfito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). El utilizado más frecuentemente para tratar camarones es el MBS, porque exhibe buena estabilidad química contra la auto oxidación en la fase sólida. [6]

El uso de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), bien sea mediante inmersiones en soluciones a ciertas concentraciones o mediante un roció con o sin agregar ácido cítrico, provee un efectivo control del oscurecimiento enzimático del camarón. El MBS comercial es de bajo precio y totalmente soluble en agua. El MBS origina diversos productos según la acides del agua. El MBS se presenta en el mercado en forma de un polvo blanco. La humedad descompone el MBS. La acción inhibidora del MBS sobre la enzima polifenol oxidasa es irreversible. [6]

La metodología tradicional de tratamiento con MBS resulta en concentraciones de SO_2 en el camarón que sobrepasa los límites aceptados para el mercado europeo. La metodología tradicional involucra la preparación de soluciones con 100kg de MBS en 500L de agua a temperatura ambiente en pilas. Los camarones recién cosechados son bañados en las soluciones utilizando canastas o mallas durante 3 o 4 minutos. [6]

La detección de residuos de SO_2 en tejidos de camarones se realiza con dos métodos de laboratorio, que son: Monier-Williams (M-W) e Iodometría (IM). El método de M-W es empleado internacionalmente. El método de IM es menos costoso y necesita menos tiempo para realizar cada análisis. La Comunidad Económica Europea (CEE) actualmente acepta hasta 150 ppm de SO_2 en camarones enteros tratados con MBS. [6]

Cosechar camarones más pequeños, contribuirá a la eficiencia productiva de la empresa, acortando los ciclos de producción y reduciendo el tiempo de exposición de los camarones a diferentes patógenos. [6]

V.3 Yodimetría

Esta parte de la volumetría incluye los métodos analíticos que se hacen con una solución valorada de yodo. En una titulación por yodimetría el yodo actúa como oxidante y se usa para cuantificar directamente los elementos que tienen un potencial normal de reducción menor al del yodo. [9]

V.3.1 Métodos yodimétricos

Son métodos directos de análisis que utiliza como reactivo valorante una solución de yodo y que permite analizar sustancias o analitos reductores fuertes normalmente en soluciones neutras o débilmente ácidas. [9]

El yodo es soluble en agua en la proporción de 0.001 mol/L, a temperatura ambiente es muy soluble en soluciones, con ión yoduro presenta bajo poder oxidante, que solo le permite reaccionar con sustancias fácilmente oxidables, lo que determina una aplicación limitada. [9]

El ión triyoduro constituye la especie principal que existe en las soluciones de yodo, tanto en las utilizadas como reactivo valorante, en los métodos directos e indirectos (por conveniencia en las ecuaciones se escribe I_2 en lugar del ión complejo triyoduro). [9]

V.3.2 Punto Final

Se determina en función del primer exceso del yodo que se utiliza como valorante, existen varios métodos para determinar cuándo termina la reacción de titulación. [9]

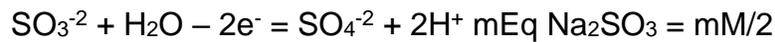
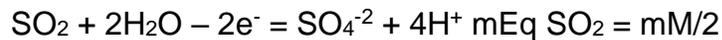
- Yodo como auto indicador, donde la primera gota en exceso de solución de yodo comunica un color amarillo. (Método no muy sensible). [9]
- Es más sensible al agregar un solvente orgánico invisible con el agua. (Cloroformo, Benceno y CCl_4) la mayor parte del yodo presente, pasa al agitar a la capa orgánica y da color rojo violeta. [9]
- Usando una suspensión acuosa de almidón, este se agrega al inicio de la valoración y en punto final se visualiza un color azul intenso debido a la formación del complejo yodo-almidón. [9]

V.3.3 Determinaciones Yodimétricas

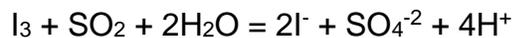
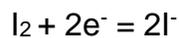
- Determinación de sulfito o anhídrido sulfuroso:

Numerosos reductores pueden valorarse por yodimetria como por ejemplo SO_2 , SO_3^{-2} . Todos estos reductores al actuar como tales se oxidan a SO_4^{-2} . [9]

La valoración se efectúa en medio sulfúrico y las semireacciones correspondientes son:



Al titular con yodo las oxido-reducciones son:



Las determinaciones pueden realizarse por técnica directa o por técnica indirecta por retorno. [9]

- **Técnica Directa**

Se valoran agentes reductores y para ello se emplea como titulante una solución de yodo en medio sulfúrico. [9]

Esta técnica tiene el inconveniente que da resultados bajos en la titulación. Esto se debe a:

- a. Pérdidas de SO_2
- b. Oxidación del SO_2 con el oxígeno del aire

c. Reducción con el HI (obtenido en la reacción implicada en la titulación)

▪ **Técnica Indirecta por retorno**

Se coloca en el Erlenmeyer un volumen exacto de solución de yodo, se acidifica el medio con ácido sulfúrico. Posteriormente se adiciona la muestra problema. El exceso de yodo se titula por retorno con solución de tiosulfato de sodio. Casi al final de la titulación, cuando la solución presenta débil coloración amarilla (por el yodo que queda sin reaccionar), se agrega la solución de almidón (indicador). [9]

De esta manera la solución se torna color azul y se continúa titulando con tiosulfato de sodio hasta desaparición del color azul. [9]

V.4 Sulfitos como conservante y su control en los alimentos

¿Qué son los sulfitos?

Los agentes sulfitante han sido ampliamente utilizados a lo largo de la historia debido a sus múltiples funciones. Pueden encontrarse en productos farmacéuticos, bebidas y alimentos, empleándose en estos últimos como aditivos alimentarios de acción conservadora y antioxidante. Incluyen el dióxido de azufre (SO₂) y distintos sulfitos inorgánicos que generan SO₂ en las condiciones de uso. Su mecanismo de acción es la inhibición del deterioro provocado por bacterias, hongos y levaduras, así como las reacciones pardeamiento enzimático y no enzimático que tienen lugar durante el procesamiento de los alimentos o el almacenamiento de los mismos. [6]

¿En qué alimentos pueden encontrarse?

En España, el uso de dióxido de azufre y los sulfitos se permiten en determinadas condiciones, en una amplia variedad de alimentos. Su uso se autoriza en alimentos diversos como galletas, siropes, productos de aperitivo, patatas, vinos y cervezas, productos vegetales frescos, confituras y mermeladas, frutos secos, crustáceos, moluscos y carnes. Las dosis máximas permitidas dependen del alimento y comprende un amplio rango de concentración que oscila entre los 10 y los 2000 mg/kg de SO₂. [6]

¿Por qué es necesario su control?

A pesar de su amplio uso y de su eficacia como conservadores, a los sulfitos se le atribuyen diversos efectos adversos en humanos, relacionados con su ingestión, particularmente en personas sensibles o vulnerables a los mismos. Afectan principalmente algunos individuos asmáticos (5-10%) y a personas con un trastorno que afecta al metabolismo de sulfitos caracterizado por un deficiente de la enzima sulfito-oxidasa, habiéndose registrado en asmáticos reacciones adversas como dermatitis, dolor de cabeza, irritación del tracto gastrointestinal, urticarias, exacerbación del asma e incluso shock anafiláctico, y en el caso del trastorno metabólico hasta lesiones oculares y daño cerebral grave. [6]

Otro aspecto a tener en consideración que hacen necesario su control, es la pérdida del valor nutricional de algunos alimentos debido a la capacidad que tienen los sulfitos para descomponer la tiamina o vitamina B1 en sus componentes, tiazol y pirimidina. Por este motivo el uso de sulfitos debe permanecer restringido al mínimo nivel necesario tecnológicamente, sobre todo en alimentos ricos en tiamina como la carne. [6]

Debido a estas razones, el análisis de dióxido de azufre en alimentos constituye una actividad importante. [6]

¿Cómo se encuentra el dióxido de azufre en los alimentos?

Los sulfitos cuando se adicionan a los alimentos, entran en contacto con su medio acuoso y sufren un proceso de disociación por el que los oxoaniones se separan de sus cationes, dependiendo del pH, la fuerza iónica y la temperatura del medio. Con ello se genera un equilibrio químico dinámico entre especies (SO_2 , HSO_3^- y aniones sulfitos y bisulfito), que se encuentra más desplazado hacia la formación de una u otras, en función de las condiciones del medio, de forma que toda coexisten pero en distintas proporciones. [6]

Parte del sulfito disociado (mayoritariamente la forma bisulfito o HSO_3^-) puede unirse a ciertos componentes del alimento de forma reversible o irreversible. Dichas fracción se denomina sulfito combinado, siendo la fracción de sulfito no

ligada al alimento el sulfito libre, el cual permanece en forma disociada en equilibrio dinámico. El conjunto de ambas fracciones se denomina sulfito total. [6]

V.5 Validación de métodos

V.5.1 Definición

La validación de un método es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico utilizado para una prueba en concreto es adecuado para su uso previsto. Los resultados de la validación del método pueden utilizarse para juzgar la calidad, la fiabilidad y la constancia de los resultados analíticos, se trata de una parte integrante de cualquier buena práctica analítica. [1]

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurarse que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados. [1]

Los laboratorios que adoptan los métodos recomendados por la UNODC (Naciones Unidas contra la Droga y el Delito) deben o bien revalidarlos o bien verificarlos como proceda para garantizar su procedimiento adecuado en su entorno habitual. La verificación supone menos operaciones experimentales que la validación. [1]

Todos los métodos nuevos que se introduzcan en un laboratorio deben estar además documentados, y todos los analistas que lo vayan a utilizar han de recibir una formación adecuada y demostrar su competencia en su utilización antes de empezar a actuar en casos concretos. Los procedimientos recomendados por los fabricantes han de respetarse lo máximo posible, en caso contrario, si se introducen cambios importantes se necesitará una validación completa. Si un método se modifica en una situación nueva (por ejemplo, una muestra de matriz nueva) se necesitará una revalidación o una verificación, según el alcance de la modificación y el carácter de la nueva situación. Por ejemplo, se necesitara una revalidación si un método diseñado para actuar con orina se utiliza con sangre; se necesitará una verificación si se utiliza una columna cromatografía de un carácter o una dimensión diferente. [1]

La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como un procedimiento normalizado de trabajo. Una vez validados o verificados los métodos, su utilización habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable, por ejemplo, el director del mismo. [1]

En el “certificado de método autorizado” o documento similar que se establezca en el manual de garantía de calidad se anotaran los detalles del método y los datos en que se basó su evaluación. [1]

Tómese nota de que los procedimientos normalizados de trabajo para validar y verificar un método, lo mismo que cualquier otro procedimiento normalizado que figure en el manual de calidad del laboratorio, deben de ser aprobados por el director de laboratorio. [1]

Una vez aprobados, es fundamental que se respeten estrictamente todos ellos. Si se introducen variaciones, debe dejarse constancia documental del hecho. Si se introduce un cambio importante será necesario volver a validar las nuevas condiciones del método. En cualquier caso, debe utilizarse la última versión aprobada de los procedimientos normalizados de trabajo. [1]

La documentación que se maneja en un sistema de garantía de la calidad es compleja por naturaleza y por consiguiente los laboratorios han de disponer de un procedimiento adecuado de control de la documentación, como se recomienda en las “Orientaciones para la implementación de un sistema de gestión de la calidad en los laboratorios de análisis”. [1]

V.5.2 Parámetros para la validación

V.5.2.1 Linealidad

Tradicionalmente se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito buscado (rango de trabajo). El rango de trabajo viene definido por la finalidad del método y puede presentar solo una parte de la totalidad de la línea recta. Habitualmente los criterios de aceptación implican una prueba de la bondad de ajuste. Frecuentemente se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación (r) elevado, del 0.99. Sin embargo, este criterio no basta para demostrar que existe una relación lineal, por lo que cabe considerar que se puede utilizar un método que no permita establecer un coeficiente de correlación tal alto como 0.99 pero permita cumplir los fines previstos. [2]

Estos parámetros no son aplicables a los métodos cualitativos salvo si se establece un umbral de concentración para reflejar resultados. [2]

V.5.2.2 Precisión (Condiciones de repetibilidad y precisión intermedia)

La precisión mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. [2]

Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, según opinión general, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles. [2]

La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento (por ejemplo, cromatografía en fase gaseosa) o los mismos materiales (por ejemplo, reactivos para pruebas visuales) y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferente laboratorio) implica que las condiciones solo serán reproducibles. La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación o desviación típica

relativa de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente. La precisión depende de la concentración y debe medirse con concentraciones diferentes dentro del rango aceptado, normalmente en la parte baja, media y alta de esto.

V.5.2.3 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de incertidumbre. El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza. Para estimar el límite de detección pueden utilizarse varios métodos, los cuales depende del análisis en blanco y el examen de la relación entre la señal y el ruido. Por lo general se acepta un requisito mínimo de relación señal/ruido de 3/1. El límite de detección no es un parámetro robusto y puede resultar afectada por cambios menores del sistema analítico (por ejemplo, temperatura, pureza de los reactivos, efectos de matriz, condiciones instrumentales). Por tanto, es importante que este parámetro sea siempre verificado por laboratorios que hayan adoptado métodos previamente válidos. [2]

El límite de cuantificación es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas. [2]

V.5.2.4 Exactitud

Medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos. [2]

Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media, alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. [2]

La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Los criterios de aceptación de la exactitud deben de ser similares a los utilizados para medir la precisión. [2]

V.5.2.5 Recuperación

Por recuperación de analito en un ensayo se entiende la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero (los materiales incautados). Los experimentos de recuperación deben hacerse comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas con tres concentraciones (normalmente iguales a las de las muestras de control utilizadas para valorar la precisión y exactitud de un método). No es necesario que la recuperación del analito sea del 100 %, pero el grado de recuperación (del analito y del estándar interno) debe ser estable (con cualquier tipo de concentración analizada), precisa y reproducible (más del 20 %). [2]

V.5.2.6 Medición de la incertidumbre

Los laboratorios de análisis deben establecer y aplicar procesos de estimación de las incertidumbres de las mediciones. Tener en cuenta que la incertidumbre aumenta la garantía de que los resultados y conclusiones obtenidos con los métodos y programas analíticos utilizados permiten cumplir los objetivos fijados. [2]

En metrología, la incertidumbre se define como un parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que puede atribuirse razonablemente al mensurando. (Mensurando: cantidad concreta medida). [2]

En términos más prácticos la incertidumbre se puede definir como la probabilidad o el nivel de confianza. Cualquier medición que hagamos entrañara un cierto grado de incertidumbre, por lo que el intervalo de incertidumbre que se fije será el

rango dentro del cual se situará el valor real con un determinado grado de confianza del 95%. [2]

Entender que significa la incertidumbre es fundamental para interpretar los resultados e informar sobre ellos. El laboratorio debe intentar al menos identificar todos los motivos de incertidumbre y hacer una estimación razonable de ellos, y debe asegurarse de que la forma de informar sobre los resultados no transmite una falsa sensación de incertidumbre. [2]

La incertidumbre de las mediciones, por lo general, tiene muchos componentes. La incertidumbre se calcula estimando los errores que se producen en las distintas etapas del análisis, por ejemplo, la etapa pre analítica la homogeneización, el pesaje, el pipeteado, la inyección, la extracción, la derivación, la recuperación y las curvas de calibración. Los datos exigidos para la validación, por ejemplo, la exactitud y precisión en condiciones de repetibilidad/reproducibilidad, reflejan ya muchos de estos factores y deben de ser utilizados. [2]

V.5.3 Supervisión y control del funcionamiento del método.

Después de haber sido validado o verificado, y de haberse empezado a utilizar, cualquier sistema de garantía de la calidad exige una vigilancia continua para establecer si sigue funcionando de acuerdo con las especificaciones. Este proyecto de vigilancia supone un control continuo de la calidad del método a través de muestras en blanco, controles y calibradores y el examen de los componentes del sistema (lo que a veces se denomina prueba de la conveniencia del sistema), por ejemplo, funcionamiento de las columnas cromáticas en términos de resolución y forma de los picos, respuesta de los detectores y especificaciones de los reactivos. Para el control del método deben establecerse unos límites claros (por ejemplo, la variabilidad aceptable de la respuesta del detector), así como las medidas correctivas que deben adoptarse si se traspasan, entre ellas la recalibración, la reverificación o la revalidación del método. [2]

VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1 Equipos y Materiales

VI.1.1 Equipo involucrado:

Destilador marca BÜCHE serie B324, se basa en una destilación simple que sirve para separar sistemas materiales que tengan sustancias cuyos puntos de ebullición sean distintos, en este caso la destilación de una solución de metabisulfito de sodio utilizando como matriz camarones.

VI.1.2 Materiales

- Beaker de 50ml
- Beaker de 250ml
- Tubos de Destilación
- Pipeta de 10ml (Clase A)
- Bureta de 10ml
- Probeta de 100ml
- Espátula
- Erlenmeyer de 1000ml

VI.2 Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico al 5N
- Hidróxido de sodio en lenteja (Merck)
- Solución estándar de Yoduro-Yodato
- Almidón 1%
- Agua Destilada
- Silicona Anti-espumante

VI.3 Procedimiento

VI.3.1 Preparación de Soluciones

➤ **Solución de Hidróxido de Sodio 5N**

Se prepara una solución de 250ml de NaOH de concentración 5N.

$$N = \text{eq/Lsoln} \quad 5N = 5\text{eq/Lsoln}$$

Cálculo del peso Equivalente del NaOH

$$PE = M/\theta$$

M= Peso molecular del NaOH.

θ = Numero de OH⁻ presentes en la disociación.

$$PE = M/\theta = 40\text{g}/1\text{eq} = 40\text{gr/eq}$$

$$PE_{(\text{NaOH})} = 40\text{g/eq}$$

Cálculo de los g_(NaOH) para preparar 250ml de Solución

40g	5eq	250ml	= 50g NaOH
Eq	1000ml		

A continuación se trasladaran los 50g de NaOH a un matraz aforado de 250ml, diluir con agua destilada hasta la marca de aforación.

➤ **Solución de Almidón al 1%**

1. Se prepara una solución de 100ml de almidón de concentración 1%.
2. Se pesa 1g de almidón soluble en una balanza, se calienta 150ml de agua destilada en un beaker de 250ml hasta ebullición tomar 50ml de agua caliente y se le agrega 1gr de almidón previamente pesado y se forma una pasta.
3. Se traslada la pasta formada a un matraz aforado de 100ml y se diluye hasta la marca de aforación con agua caliente.

➤ **Solución Madre de Metabisulfito de sodio 1000ppm**

Preparación de 500ml de solución de MBS a 1000ppm

$$500\text{ml} \cdot 1000\text{mg}/1000\text{ml} = 500\text{mg} (0.5\text{g})$$

Trasladar los 500mg de MBS previamente pesado a un matraz aforado de 500ml y diluir con agua destilada hasta la marca de aforación.

Niveles de concentración

1. **50 ppm:** Tomar una alícuota de 10 ml de la solución madre de concentración 1000 ppm.

$$\text{Cálculo } V_c = 50 \cdot 200 / 1000 = 10 \text{ ml}$$

2. **70 ppm:** Tomar una alícuota de 14 ml de la solución madre de concentración 1000 ppm.

$$\text{Cálculo } V_c = 70 \cdot 200 / 1000 = 14 \text{ ml}$$

3. **90 ppm:** Tomar una alícuota de 18 ml de la solución madre de concentración 1000 ppm.

$$\text{Cálculo } V_c = 90 \cdot 200 / 1000 = 18 \text{ ml}$$

4. **110 ppm:** Tomar una alícuota de 22ml de la solución madre de concentración 1000ppm.

$$\text{Cálculo } V_c = 110 \cdot 200 / 1000 = 22 \text{ ml}$$

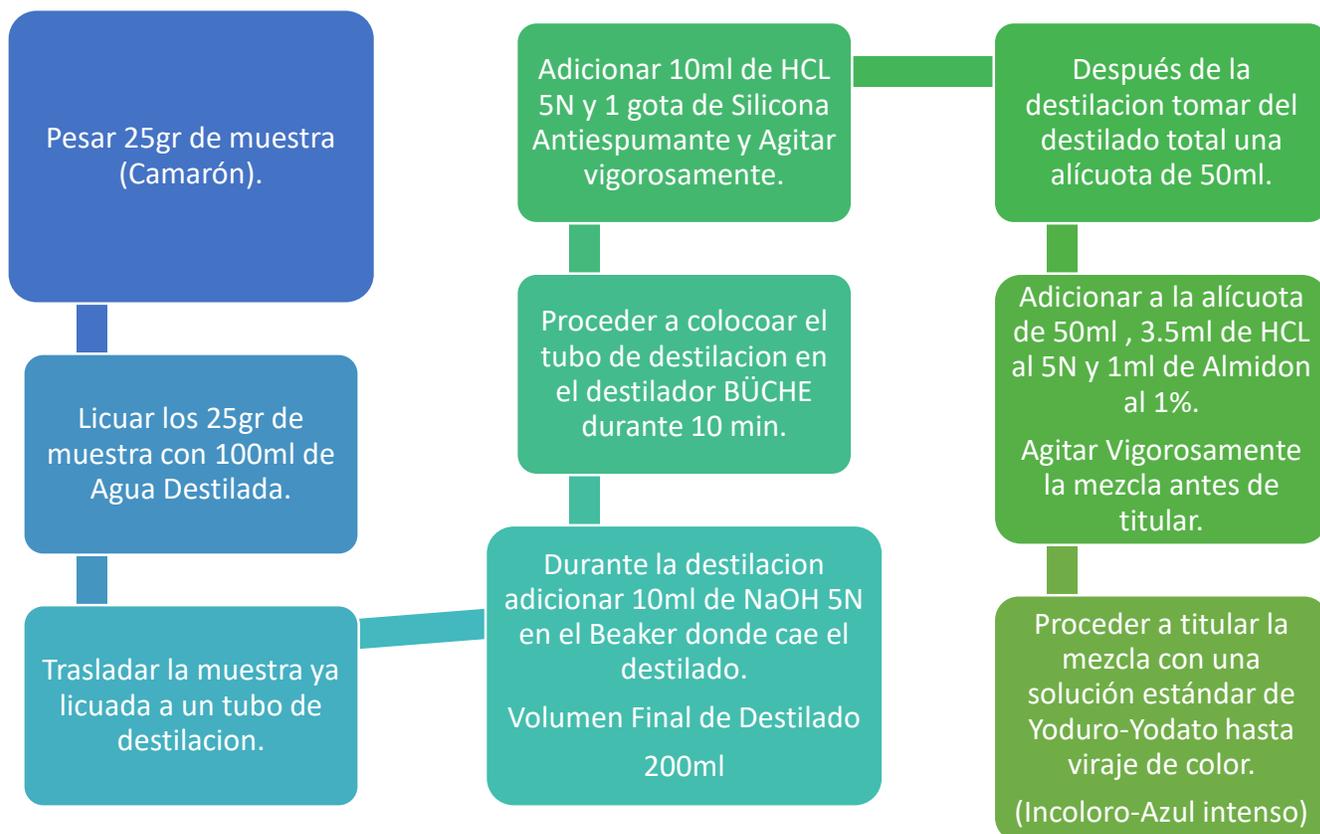
5. **130ppm:** Tomar una alícuota de 26ml de la solución madre de concentración 1000ppm.

$$\text{Cálculo } V_c = 130 \cdot 200 / 1000 = 26\text{ml}$$

6. **150ppm:** Tomar una alícuota de 30ml de la solución madre de concentración 1000ppm

$$\text{Cálculo } V_c = 150 \cdot 200 / 1000 = 30\text{ml}$$

VI.3.2 Tratamiento de la Muestra



VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

VII.1 LINEALIDAD

Este estudio se realizó con el objetivo de encontrar el grado de linealidad del método, para esto se efectuó una curva de calibración con estándares de metabisulfito entre 50 – 150 mg/kg a cada solución estándar (concentraciones teóricas) se le realizó la valoración y se encontró la concentración experimental del metabisulfito, los resultados se presentan en la tabla N°1 y a estas dos variables se les evalúa la linealidad.

Tabla No.1 Datos de la curva de calibración normal para metabisulfito de sodio en camarón.

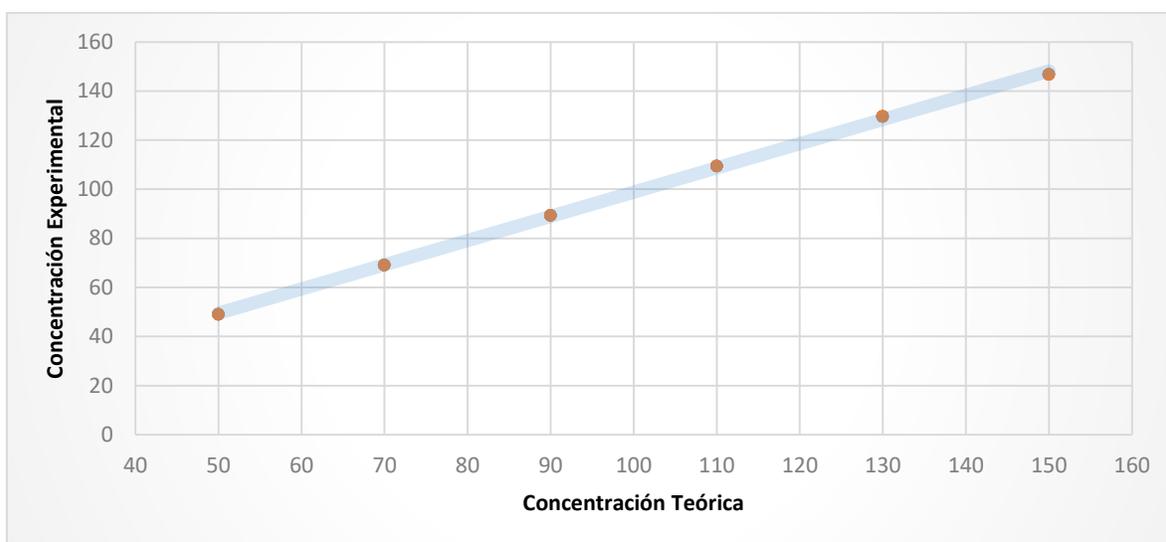
Concentración de MBS mg/Kg	Volumen Adicionado de Valorante	Concentración de MBS experimental mg/Kg
50	0.85	49
50	0.85	49
50	0.85	49
70	1.20	69.12
70	1.20	69.12
70	1.20	69.12
90	1.55	89.28
90	1.55	89.28
90	1.55	89.28
110	1.90	109.44
110	1.90	109.44
110	1.90	109.44
130	2.25	129.6
130	2.25	129.6
130	2.25	129.6
150	2.60	146.76
150	2.60	146.76
150	2.60	146.76

De estos resultados se evalúa si existe relación lineal entre las concentraciones teóricas de MSB y las concentraciones obtenidas experimentalmente de MSB, esta se evalúa de diferentes maneras tales como: coeficiente de determinación, comportamiento de la gráfica, gráfico de residuales, test de linealidad y veracidad del modelo.

VII.1.1 Coeficiente de determinación y comportamiento de la gráfica

Para evaluar la linealidad del método primeramente se calculó el coeficiente de determinación obteniendo un valor de (r^2) de 0.9994, lo que indica que el valor es cercano a la unidad. Esto quiere decir que existe una fuerte correlación entre la variable dependiente (Concentración Experimental) y la variable independiente (Concentración Teórica) en el rango de aplicación seleccionado para determinación de metabisulfito de sodio.

Gráfico N°1 Linealidad (Concentración Teórica vs Concentración Experimental)



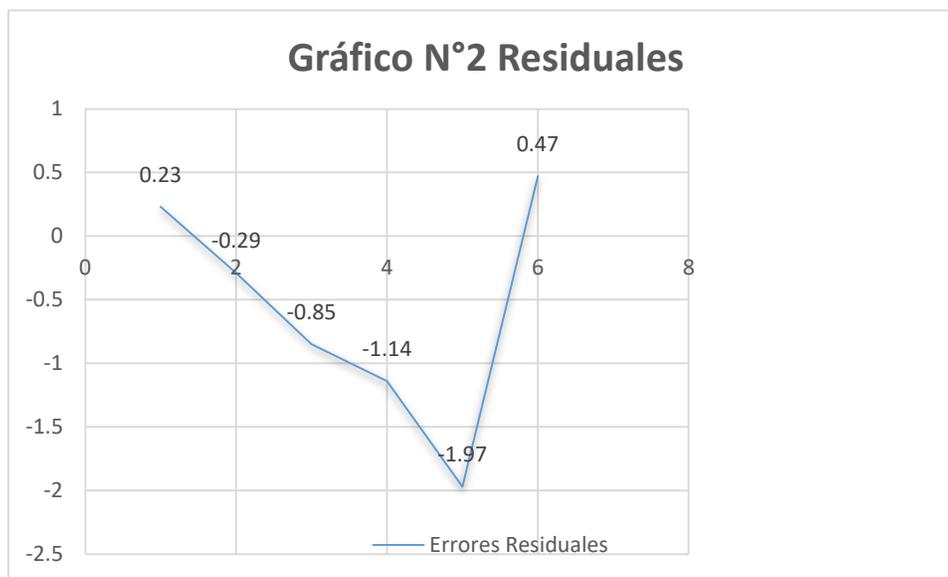
De acuerdo a los datos utilizados para la elaboración del gráfico, se puede observar que se encuentran dentro de la recta de mejor ajuste lo que demuestra que hay una fuerte correlación entre ellos cumpliendo así con un modelo de regresión lineal.

VII.1.2 Gráfico de Residuales

Otra forma de evaluar la linealidad del método es elaborar un gráfico de residuales, se planteó un modelo de regresión lineal el cual es $Y = a + bx$, donde Y será la concentración ideal según el modelo de regresión $a =$ intercepto, $b =$ pendiente y x será la concentración experimental, a continuación se muestra tabla de resultados donde se aplicó el modelo de regresión que nos proporcionó la concentración ideal según el modelo, los resultados obtenidos de la diferencia entre de la concentración ideal según el modelo y la concentración experimental son los errores residuales, los cuales fueron plasmados en el siguiente gráfico, como se puede observar cada uno de los errores residuales están dentro de los límites permitidos de menos $\pm 2S_{xy}$ (desviación estándar residual), por lo que podemos afirmar que el gráfico cumple con el modelo de regresión lineal planteado ya que los resultados tienden a la linealidad.

Tabla N°2. Valores para el gráfico de residuales

Concentración Teórica	Concentración según el modelo	Concentración Experimental	Error Residual
50	49.23	49	0.23
70	68.83	69.12	-0.29
90	88.43	89.28	-0.85
110	108.30	109.44	-1.14
130	127.63	129.60	-1.97
150	147.23	146.76	0.47



VII.1.3 Test de linealidad

Se evaluó la relación lineal de la concentración teórica y la concentración experimental con $t_{\text{calculado}}$ de (160.28) y t_{tabulado} a $n-2$ grados de libertad con nivel de confianza 0.05 (2.68). Se plantearon hipótesis para estimar la relación lineal entre dichas concentraciones las cuales son:

H_0 = No existe relación lineal entre la concentración adicionada y la respuesta del método

H_a = Existe relación lineal entre la concentración adicionada y la respuesta del método

Al concluir con la prueba de correlación del contraste t , aceptamos la hipótesis alternativa dado que t_{cal} es mayor que t_{tabulado} , por tanto existe relación lineal entre la concentración teórica y la concentración experimental.

VII.2 PRECISIÓN

La repetibilidad y reproducibilidad (precisión intermedia) son parámetros de desempeño que se utilizan para la evaluación de la precisión en la validación de un método.

VII.2.1 Repetibilidad de muestra

Se evaluó la repetibilidad para comprobar el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplicó repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas utilizando los mismos instrumentos y método establecido en un intervalo de 2 días.

A continuación se muestra la siguiente tabla donde se refleja los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad utilizando muestras a como el método lo proporciona.

Tabla N°3. Repetibilidad de los resultados del A1 y A2

Camarón/Replicas		Analista 1	Analista 2
Día 1	1	40	43
	2	43	40
	3	40	43
Día 2	4	40	40
	5	43	43
	6	40	43
Promedio		41.00	42.00
Desv. Estándar		1.55	1.55
%Coeficiente Variación		3.78%	3.69%

Luego se trataron los datos estadísticamente, calculando la media (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación el cual será tomado para evaluar la repetibilidad del método según los criterios de aceptación que sugieren valores menores al 7.5% según WEST-EUROPEAN FISH TECHNOLOGIST´ ASSOCIATION (WEFTA), "Determination of total sulfite in Shrimps".

El coeficiente de variación de los resultados tanto para los datos correspondientes a la repetibilidad como para la precisión intermedia no debe ser mayor del 7.5%.

VII.2.2 Precisión Intermedia de la muestra

Para la evaluación de la precisión intermedia se prepararon muestras homogéneas a como lo indica el procedimiento de análisis, la siguiente tabla refleja los resultados obtenidos en la prueba de la precisión intermedia. A los resultados obtenidos por los dos analistas se mezclan entre sí para obtener el coeficiente de variación combinado para así estimar la precisión intermedia.

Tabla N° 4. Precisión intermedia de los resultados de A1 y A2

Camarón/ Replicas		Analista 1	Analista 2
Día 1	1	40	40
	2	43	40
	3	37	40
Día 2	4	40	40
	5	37	43
	6	40	43
Promedio		40.25	
Desv. Estándar		2.00	
%Coeficiente Variación		4.98%	

Según el criterio de aceptación correspondiente a la precisión intermedia el coeficiente de variación no debe ser mayor al 7.5%. Se demostró que el método cumple con el parámetro ya que el coeficiente de variación obtenido experimentalmente es menor que el valor establecido por el criterio.

VII.2.3 Repetibilidad del estándar a 70ppm

Se evaluó la repetibilidad para comprobar el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplicó repetidamente a un nivel de concentración de 70 ppm por dos analistas por triplicado utilizando los mismos instrumentos y método establecido en un intervalo de 2 días.

Luego se trataron los datos estadísticamente, calculando la media (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación el cual será tomado para evaluar la repetibilidad del método según los criterios de aceptación que sugiere un valor de coeficiente de variación menor del 7.5%.

A continuación se muestra la siguiente tabla donde se refleja los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad utilizando muestras a como el método lo proporciona.

Tabla N°5. Repetibilidad de los resultados de A1 y A2 en muestra adicionada

Adición de Metabisulfito		Analista 1	Analista 2
Día 1	1	69.12	72
	2	69.12	69.12
	3	66.24	66.24
Día 2	4	69.12	69.12
	5	69.12	66.24
	6	66.14	66.24
Promedio		68.16	68.16
Desv. Estándar		1.48	2.35
%Coeficiente Variación		2.18%	3.44%

Se demostró que el método cumple con el parámetro ya que el coeficiente de variación obtenido experimentalmente es menor que el valor establecido por el criterio de aceptación.

VII.2.4 Precisión intermedia del estándar a 70ppm

Para la evaluación de la precisión intermedia se prepararon muestras adicionadas con metabisulfito de sodio a un nivel de concentración de 70ppm, analizadas en dos días diferentes por dos analistas, cada muestra por triplicado, a como lo indica el procedimiento de análisis, a continuación la siguiente tabla refleja los resultados obtenidos en la prueba de precisión intermedia por ambos analistas, estos resultados se mezclan entre sí para obtener el coeficiente de variación combinado y así estimar la precisión intermedia.

Tabla N°6. Precisión intermedia de A1 y A2 con muestra adicionada

Adición de Metabisulfito		Analista 1	Analista 2
Día 1	1	69.12	72
	2	69.12	69.12
	3	66.24	66.24
Día 2	4	69.12	69.12
	5	69.12	66.24
	6	66.14	66.24
Promedio		68.16	
Desv. Estándar		1.87	
%Coeficiente Variación		2.75%	

Según el criterio de aceptación para que el método cumpla con la precisión intermedia el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 7.5%, se demostró que el método cumple con el parámetro, ya que el coeficiente de variación obtenido experimentalmente es menor que el valor establecido por el criterio.

VII.3 EXACTITUD

Para la evaluación de la exactitud se analizaron muestras de Metabisulfito de sodio a 6 niveles de concentración diferentes (50-150ppm), preparando una solución madre de MBS a 1000 partes por millón tomando porciones representativas para cada nivel de concentración realizando dicha medición en la camaronera SAHLMAN SEAFOODS S.A la cual fueron analizadas en tres días diferentes, 2 niveles de concentración por día.

La exactitud está relacionada con el término porcentaje de recobro que caracteriza los errores sistemáticos presentes en los resultados de los análisis, en este caso este fue el parámetro de desempeño para la evaluación de la exactitud del método.

VII.3.1 Recuperación o recobro

El porcentaje de recuperación es el parámetro más usado para la evaluación de la exactitud, este refleja la relación que existe entre la cantidad obtenida y la cantidad real establecida por el método

Se preparó solución madre de MBS a 1000 ppm tomando porciones representativas para los 6 niveles de concentración (50-150 ppm) cada nivel por triplicado, las cuales se analizaron aplicando el procedimiento a como dicta el método, a continuación se muestran tabulados los resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación.

Tabla N°7. Porcentaje de recuperación de muestras adicionadas

Concentración Añadida	Concentración Recuperada	% Recobro
50	49	98
50	49	98
50	49	98
70	69.12	98.7
70	69.12	98.7
70	69.12	98.7
90	89.28	99.2
90	89.28	99.2
90	89.28	99.2
110	109.44	99.49
110	109.44	99.49
110	109.44	99.49
130	129.6	99.69
130	129.6	99.69
130	129.6	99.69
150	146.76	99.84
150	146.76	99.84
150	146.76	99.84
Promedio		98.82

El porcentaje de recuperación se calculó multiplicando por 100 la razón entre valor obtenido por el método y el valor de referencia; El valor de 98.82% indica que hay buena exactitud y el parámetro de desempeño cumple con el criterio de aceptación que acepta un valor de porcentaje de recuperación de $(97.9 \pm 6.4\%)$.

VII.4 LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

Para evaluar el límite de detección y límite de cuantificación se tomaron los valores del intercepto y la pendiente obtenidos en la elaboración de la curva de calibración normal para evaluar la linealidad, a los que se les calculo la desviación estándar que fueron necesarias para determinar los limites.

$$LD = \frac{3.3 * Sb0}{b1}$$

$$LC = \frac{10 * Sb0}{b1}$$

$$LD = \frac{3.3 * 0.006}{0.98} = 0.02$$

$$LC = \frac{10 * 0.006}{0.98} = 0.06$$

Tabla N°8. Valores de los parámetros de regresión para determinar LD y LC

Pendiente (b1)	0.98
Intercepto (b0)	0.23
Desvío del Intercepto (Sbo)	0.006
Desvío de Pendiente (Sb1)	0.65
Desviación Residual (Sx/y)	0.89

Donde:

Sbo (0.006) es la desviación estándar del intercepto de la curva de calibración normal.

b1 (0.98) es la pendiente de la curva de calibración normal.

Los resultados obtenidos para el límite de detección y cuantificación fueron 0.02 y 0.06 ppm respectivamente la cual nos muestra que son valores relativamente pequeños.

VII.5 Criterio de Aceptación de Parámetros de Validación.

Cuando evaluamos los parámetros de validación de un método debe de reportarse una declaración de aptitud el cual consiste en avaluar cada parámetro y compararlo con los niveles de aceptación para ver el cumplimiento de cada uno de ellos. En la tabla N°9 se presentan los criterios de aceptación de cada uno de los parámetros.

Tabla N°9. Evaluación de los Criterios de Aceptación.

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultados	Cumplimiento
Linealidad	a) Comportamiento lineal en la gráfico de Concentración Teórica vs Concentración experimental. b) Datos aleatorios en el gráfico de residuales.	Comportamiento lineal de la gráfica. Residuales aleatorios a la recta de mejor ajuste.	Cumple
Intervalo de Trabajo	a) Pendiente: Valor cercano a 1. b) Coeficiente de correlación: $r \geq 0.99$	Pendiente 0.98 $r = 0.999$	Cumple
Exactitud. Porcentaje de Recuperación	Recuperaciones entre 91.5% y 104.3%	Valores entre 98% y 99.84% Para 6 niveles.	Cumple
Precisión	$CV < 7.5\%$		
Repetibilidad		Menores del 4%	Cumple
Precisión Intermedia		Menores del 5%	
Observaciones: Dado que todos los parámetros de validación evaluados cumplen con los criterios de aceptación podemos afirmar que el método para la determinación de metabisulfito de sodio por yodimetría en muestras de camarón es apto para su aplicación.			

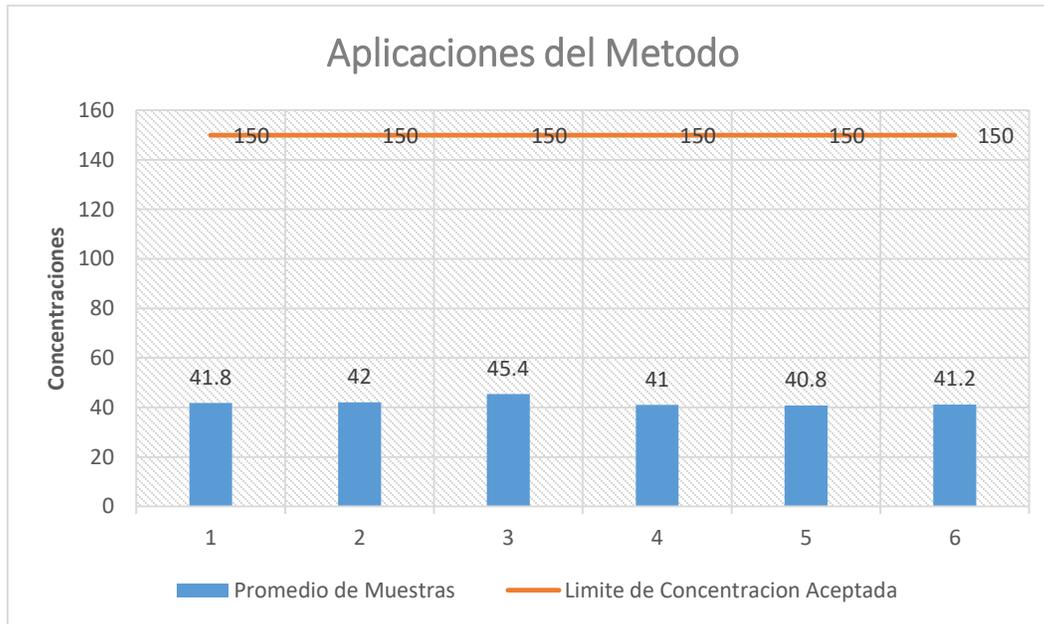
VIII. APLICACIONES DEL METODO

Para aplicar el método se tomaron cuatro muestras de camarón brindadas por la empresa camaronera Sahlman Seafoods of Nicaragua S.A para determinar metabisulfito de sodio (MBS) por Iodometria y se les realizo la medición con cinco replicas para cada una y se les realizo la medición de metabisulfito las cuales presentaron promedios y desviaciones estándares que se muestran a continuación:

Tabla N°9. Aplicación del método para muestras

Replicas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1	44	44	46	37	40	41
2	42	40	47	38	44	40
3	40	42	44	32	41	43
4	43	43	44	32	40	44
5	40	41	46	34	39	38
Promedio	41.8	42	45.4	41	40.8	41.2
Desv. Estándar	1.78	1.58	1.34	2.12	1.92	2.38

Grafico N°3. Grafico del comportamiento del método en aplicaciones con muestras de camarón a niveles de concentración de 0 a 150 ppm de sulfitos.



Se pudo observar que los resultados obtenidos durante el tiempo de prueba de aplicación del método, se encuentran en el rango permisible regulado por la FDA, que sugiere un máximo de 150 ppm, por tanto el método logra determinar con precisión y exactitud los ppm de metabisulfito de sodio presente en el camarón destinado al consumo humano.

IX. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la validación del método Iodometrico, Para la determinación de metabisulfito de sodio en muestras de camarón. Con el objetivo de verificar si el método cumple con los criterios de aceptación de los parámetros para la validación de métodos analíticos.

Se evaluaron parámetros de desempeño del método. En caso de la linealidad la cual se realizó durante 3 días, se obtuvieron valores de coeficientes de regresión próximos a uno, obteniendo un coeficiente de determinación $r^2= 0.9994$ el comportamiento lineal de la gráfica de regresión así como la aleatoriedad de los residuales todos ellos cumplieron con los criterios de aceptación. Para la precisión la cual se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia de la muestra y repetibilidad y precisión intermedia de estándares aplicando el mismo procedimiento analítico y realizada por dos analistas en dos días se obtuvieron valores de coeficientes de variación (Repetibilidad de muestra: $A1=3.78\%$ y $A2=3.69\%$ y una (precisión intermedia de 4.98%) para la repetibilidad de muestra adicionada se obtuvieron valores de coeficientes de variación de ($A1=2.18\%$ y $A2=3.44\%$) y una precisión intermedia de (2.75%) respectivamente. Con respecto a la repetibilidad y a la precisión intermedia del método se obtuvieron valores de coeficientes de variación menores del 7.5% a como lo indica los criterios de aceptación. Esto indica que se tiene una buena repetibilidad y precisión intermedia ya que los valores de coeficiente de variación se encuentran dentro del criterio de aceptación. La exactitud, el cual se evaluó a través del porcentaje de recuperación o recobro el cual se realizó a niveles de concentración de $50- 150\text{ppm}$ utilizando una muestra adicionada con el analito de interés (metabisulfito de sodio) y obteniendo un porcentaje de recuperación de 98.82% esto indica que hay buena exactitud y el parámetro de desempeño cumple con el criterio de aceptación que es de $(97.9 \pm 6.4\%)$ para residuos en alimentos.

Los resultados obtenidos para el límite de detección y de cuantificación fueron valores relativamente pequeños de 0.02 ppm para el límite de detección y 0.06

ppm para el límite de cuantificación. Dado los resultados de los parámetros de desempeño del método podemos afirmar que los parámetros de validación evaluados durante este estudio cumplen con los criterios de aceptación por lo que podemos afirmar que el método es apto para realizar determinaciones de MBS en muestras de camarones.

Con respecto a la aplicación del método, se realizó el análisis a seis muestras de camarón suministradas por la empresa SAHLMAN SEAFOODS y obteniéndose resultados similares dentro del intervalo aceptado que es un valor máximo de 150ppm.

X. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros parámetros de validación como robustez del método.
- Evaluar la incertidumbre del método siguiendo los pasos de la Guía para la evaluación de la incertidumbre GUM.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. "Política para la validación de métodos de laboratorio de ensayo y calibración "
 - a. DOC-ONA12-011 Versión N°:01 Revisión N°:01 Emitido por: OFICINA NACIONAL DE ACREDITACIÓN (ONA).
2. "Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos" emitido por la COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA Rev. N°.0, Clave CCAYAC-P-058.
3. Análisis químico cuantitativo. "volumetría" 1ra.edicion, HARRIS, DANIEL C.
4. Paper presented at the 14th meeting of the working group on Analytical methods of the WEST-EUROPEAN FISH TECHNOLOGIST´ ASSOCIATION (WEFTA), "Determination of total sulfite in Shrimps" plubikatie nr.229, (1991).
5. "Directrices para la validación de métodos analíticos"-UNODC-Naciones unidas, (nueva york 2010).
6. "Evaluación de tres metodologías de tratamiento con metabisulfito de sodio en la cosecha de camarones enteros para prevenir melanosis", Mario Alvares Herrera. *Publicación en línea*, Zamorano, Honduras (diciembre 2000).
7. Universitas "Validación y Verificación de métodos de ensayo", volumen 3, N°2, 2009, 14-21, ISSN 2071-2575, 2009UNAN-LEON, Editorial universitaria.

8. SEGURA A. "Nicaragua segundo productor de camarón en la región" [En línea] [Managua, Nicaragua 04 de junio 2014], URL disponible en www.elnuevodiario.com.ni/economia/321502-nicaragua-segundo-prosuctor-camaron-region/.

9. HUANCA QUISPE A.,MAMANI CHOQUEHUANCA D., "Yodimetria", *Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez*, [Publicación periódica en línea], (2015) m.monografias.com/trabajos105/yodimetria/yodimetria.shtml