

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS,
MERMELADAS Y CONFITURAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN
ATÓMICA TÉCNICA HORNO DE GRAFITO

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE PRÁCTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

PRESENTADO POR:

DANIELA BEATRIZ ALONZO ROMERO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA Y FARMACIA

FEBRERO 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MSD. NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD HONOREM)

M.Sc. KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESOR DE ÁREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS,
CÓSMETICOS Y VETERINARIOS.

M.Sc. ELISEO ERNESTO AYALA MEJÍA

ASESOR

LIC. HENRY ALFREDO HERNÁNDEZ CONTRERAS

TUTOR INTERNO

M.Sc. LUIS DAVID ALONZO HERNÁNDEZ

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGÍA DEL MINISTERIO DE SALUD

LICDA. CINDY REBECA MARTÍNEZ LINARES (TUTORA EXTERNA)

LICDA. BEATRIZ MARÍA PÉREZ RIVAS (TUTORA EXTERNA)

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por guiarme y darme sabiduría para poder terminar mi carrera.

A Lic. Celina Valle por brindarnos la oportunidad de realizar las prácticas profesionales supervisadas en el Laboratorio de Alimentos y Toxicología.

Mis docentes tutores externos Licda. Cindy Castillo y Licda. Beatriz Pérez por compartir sus conocimientos y ayudarme a lograr esta meta.

A mi tutor interno Msc. Luis Alonzo quien también me guió y me motivó para poder lograr alcanzar este sueño.

A la plataforma de toxicología del LAT conformada por: Msc. Wilfredo Belteton, Licda. Brenda Lemus, Tec. Marlene Duke y Lic Emerson Quintanilla por acogerme en el área y hacerme sentir parte de ellos, por compartir sus conocimientos con gran paciencia y amor, estaré profundamente agradecida.

DANIELA BEATRIZ ALONZO ROMERO

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerzas para seguir adelante día a día.

A mis padres quienes son mi principal motivación para terminar mi carrera y ser la primera profesional de mi familia.

A mis abuelos que siempre me apoyaron lo largo de mi carrera.

A mis hermanos quienes son siempre mi apoyo incondicional.

DANIELA BEATRIZ ALONZO ROMERO

ÍNDICE GENERAL

	Pág. N°
RESUMEN	
GLOSARIO	9
CAPITULO I	
1.0 Introducción	12
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	15
CAPITULO III	
3.0 Marco Teórico	17
3.1 El plomo	17
3.2 Efectos en la salud	17
3.3 Carga de morbilidad	18
3.4 Plomo en alimentos	19
3.4.1 Acumulación de plomo en plantas	19
3.5 Norma para confituras y jaleas según Codex	21
3.5.1 Definiciones del producto	21
3.5.2 Criterios de calidad	22
3.5.2.1 Requisitos generales	22
3.5.3 Defectos y tolerancias para las confituras	22
3.6 Contaminantes	22
3.7 Determinación de plomo por horno de grafito	23
3.7.1 Absorción atómica por horno de grafito	23
3.8 Fundamento teórico (GFAAS)	24
3.8 Método oficial AOAC 999.10	26
3.8.1 Plomo, Cadmio, Zinc, Cobre y Hierro	
Espectrofotometría de absorción atómica en alimentos después de la digestión por microondas	26
3.9 Proceso de validación	29
3.9.1 El protocolo de validación	29

3.10 Informe de validación	40
CAPITULO IV	
4.0 Resultados y Discusión de Resultados	42
4.1 Protocolo de validación	42
4.2 Proceso de validación	54
4.3 Informe de validación (Resumen)	55
CAPITULO V	
5.0 Conclusiones	60
CAPITULO VI	
6.0 Recomendaciones	62
Referencias Bibliográficas	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Dinámica de los metales pesados	20
2	Partes del espectrofotómetro técnica horno de grafito	24

ÍNDICE DE TABLAS

Figura N°		Pág. N°
1	Norma general de contaminantes y toxinas	23
2	Comparación FAAS Y GFAAS	25
3	Configuración del digestor de microondas	27
4	Parámetros instrumentales para GFAAS	28
5	Selectividad/ especificidad	32
6	Linealidad	33
7	Exactitud	24
8	Repetibilidad	35
9	Precisión intermedia	36
10	Reproducibilidad	37

11	Límite de detección/ cuantificación	38
12	Robustez	39
13	Incertidumbre	39
14	Linealidad, resultados	45
15	Exactitud, resultado	48
16	Precisión, resultado	50
17	Límite de detección/ cuantificación, resultado	52
18	Incertidumbre, resultado	53
19	Proceso de validación	54
20	MX1	55
21	MX2	56
22	MX3	57
23	MX4	58

GLOSARIO

OSA: Organismo Salvadoreño de Acreditación

ANOVA: Análisis de la varianza

AOAC: En inglés que significa “Association of Analytical Communities” y que en español significa “Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica”.

Espectrofotometría de absorción atómica: método que convierte elementos presentes en una muestra en átomos o iones elementales en estado gaseoso por medio de un proceso denominado atomización utilizando un espectrofotómetro.

Codex Alimentarius: Normativa para garantizar alimentos inocuos y de calidad a todas las personas y en cualquier lugar.

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. (ISO 9000:2008/3.8.5)

GFAAS: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) lo que se traduce como espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito.

FAAS: Furnace Atomic Absorption Spectrometry lo que se traduce como espectrofotometría de absorción atómica refiriéndose al método de llama.

RESUMEN

Las intoxicaciones por plomo es un tema bastante serio y mucho más recurrente de lo que esperamos, sin darnos cuenta podemos estar expuestos a dicho contaminante a través de los diferentes alimentos como las jaleas y las mermeladas que llevamos a nuestros hogares. Esto sucede gracias a que el plomo que se almacena en suelos contaminados es capaz de ser adsorbido a través de las raíces de las plantas y llegar hasta las partes aéreas de estas (hojas y frutos).

Las intoxicaciones por plomo son bastante severas, Si el grado de exposición es elevado, el plomo ataca el cerebro y el sistema nervioso central, lo que provoca coma, convulsiones e incluso la muerte, siendo los niños y las embarazadas la población de mayor riesgo.

Por lo tanto, siendo este metal tan peligroso es necesario el análisis de plomo en productos alimenticios y para esto se validó un método para la cuantificación de plomo en jaleas y mermeladas por espectrofotometría de absorción atómica y técnica horno de grafito teniendo como base el Codex alimentario que es el que nos da la clasificación y la categoría de los alimentos, en este caso jaleas, mermeladas y confituras que pertenece a la categoría 04.1.2 Frutas elaboradas sub categoría 04.1.2.5 Confituras, jaleas, mermeladas. Determinando cantidades de plomo inferiores a 0.4 mg/kg dando cumplimiento norma general de contaminantes y toxinas.

Para el proceso de validación se sigue paso a paso lo que nos indica la Guía de Validación para métodos físico - químicos de la OSA G 9.6 y de esta manera se realizó el protocolo de validación, el proceso y por último el resumen del informe cumpliendo todos los parámetros establecidos (linealidad, exactitud, precisión, límite detección, límite de cuantificación e incertidumbre) y así se puede confirmar que el método es adecuado a su propósito, obteniendo resultados dentro de los intervalos de aceptación.

También se recomienda hacer mayor énfasis en la peligrosidad de la exposición a los metales, estando alerta a cada uno de los síntomas de intoxicación y como estos pueden llegar a nuestros organismos a través de los alimentos, por lo tanto, la validación es capaz de demostrar que el método por espectrofotometría de absorción atómica técnica horno de grafito es apto para la determinación de plomo en jaleas, mermeladas y confites de dar resultados confiables.

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION

Desde siglos pasados, las intoxicaciones por plomo era algo bastante común, se asociaba con el uso directo del metal para materias primas de algunos artículos del hogar, pinturas o producto de la metalúrgica, sin embargo, no se tiene en consideración que se puede estar expuestos a este metal tan solo consumiendo alimentos contaminados como una simple mermelada o jalea comprada en algún supermercado.

La contaminación por plomo es algo serio, provocando daños a la salud muy severos que vienen desde un simple dolor de estómago hasta una falla renal crónica y la posible muerte a largo plazo.

Por lo tanto, en el siguiente trabajo conoceremos un poco de la peligrosidad de dicho metal y su efecto en el cuerpo humano, la importancia del análisis de plomo en alimentos y la forma en que se realizó según lo dicta la AOAC (Association of Analytical Communities) 999.10 Plomo, cadmio, zinc, cobre y hierro en alimentos por espectrofotometría de absorción atómica después de la digestión de microondas, y la realización de la validación del método.

Para la validación tenemos como base la guía de (G9.6) de validación de la OSA (Organismo Salvadoreño de Acreditación) para métodos analíticos físico-químicos.

Se realizó un protocolo donde se establecen los parámetros a evaluar, posteriormente el proceso de validación el cual vamos a cuantificar la cantidad de plomo por espectrofotometría de absorción atómica técnica horno de grafito, y evaluar cada uno de los parámetros de desempeño (linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión, e incertidumbre) al obtener todos los datos se procede al análisis e interpretación de resultados donde se realizará el resumen de informe de validación haciendo constar que el método cumple con cada uno de los parámetros y es apto para el fin previsto.

Dicha validación se realizó en seis meses comprendido desde el mes de marzo hasta septiembre del 2023, en Instituto Nacional de Salud – Laboratorio Nacional de Salud Pública - Laboratorio de Alimentos y Toxicología dando cumplimiento a la norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos CXS 193-1995 adoptada en

1995 Revisada en 1997, 2006, 2008, 2009 enmendada en 2010, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018. La norma correspondiente del Codex para productos es CXS 296-2009 (solo para confituras y jaleas) la cual indica que el nivel máximo de plomo en dichos alimentos debe ser inferior a 0.4 mg/kg.

Con nuestro método ya validado podemos cuantificar la cantidad de plomo en mermeladas, jaleas y confituras, demostrando la calidad y competencia del laboratorio para brindar resultados confiables y salvaguardar la vida de la población en general.

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Validar el método para la cuantificación de plomo en confituras, jaleas y mermeladas por espectrofotometría de absorción atómica técnica horno de grafito.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Elaborar un protocolo de validación basado en la Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos (G9.6) del Organismo de Acreditación Salvadoreño (OSA) para establecer los parámetros y criterios de aceptación.

2.2.2 Desarrollar el proceso de validación del método para la cuantificación de plomo en confituras, jaleas y mermeladas por espectrofotometría de absorción atómica técnica horno de grafito evaluando cada uno de los parámetros de desempeño requeridos (linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión, e incertidumbre), obteniendo los datos crudos de la validación.

2.2.3 Presentar un resumen del informe de validación que incluya el análisis e interpretación de resultados obtenidos y de esta manera demostrar que el método es apto para el fin previsto cumpliendo cada uno de los criterios de aceptación.

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Plomo ¹

El plomo es un metal tóxico que se puede encontrar de manera natural o como producto de las actividades humanas por las diferentes industrias como la metalúrgica, fábricas de baterías, pinturas etc. La OMS considera el plomo uno de los 10 productos químicos que suscitan una mayor preocupación para la salud pública y que requieren la intervención de los Estados Miembros para proteger la salud de los trabajadores, los niños y las mujeres en edad reproductiva.

Más de tres cuartas partes del consumo mundial de plomo corresponden a la fabricación de baterías de plomo-ácido para vehículos de motor. Su uso generalizado ha dado lugar a una importante contaminación ambiental, a la exposición humana y a graves problemas de salud pública en muchas partes del mundo.

La contaminación por plomo afecta a toda la población en general siendo los más afectados los niños y las embarazadas.

3.2 Efectos en la salud ³

Si el grado de exposición es elevado, el plomo ataca el cerebro y el sistema nervioso central, lo que provoca coma, convulsiones e incluso la muerte. Los niños que sobreviven a una intoxicación grave por plomo pueden padecer secuelas, como discapacidad intelectual o trastornos del comportamiento.

No existe un nivel de concentración de plomo en sangre que pueda considerarse exento de riesgo; incluso una concentración sanguínea de tan solo 3,5 µg/dl puede afectar a la inteligencia de los niños y causar problemas de comportamiento y dificultades de aprendizaje. Cuanto mayor es el nivel de exposición, más aumentan la diversidad y la gravedad de los síntomas y efectos asociados.

- Problemas de comportamiento y aprendizaje;
- Menor coeficiente intelectual (IQ, por sus siglas en inglés) e hiperactividad;
- Retraso en el crecimiento;

- Problemas de audición; y
- Anemia.

En casos raros, las altas cantidades de plomo pueden tener efectos devastadores en los niños, incluyendo convulsiones, coma y en algunos casos, incluso la muerte.

Los adultos expuestos al plomo pueden sufrir:

- Trastornos nerviosos;
- Aumento de la presión arterial e incidencia de hipertensión;
- Insuficiencia renal;
- Problemas reproductivos (tanto en hombres como en mujeres); y
- Problemas de memoria y concentración.

El plomo puede acumularse en nuestros cuerpos con el tiempo, donde se almacena en los huesos junto con calcio.

Durante el embarazo, el plomo se libera de los huesos de la madre junto con el calcio y puede transferirse de la madre, exponiendo al feto o al bebé amamantando al plomo, especialmente cuando la madre no recibe calcio de forma adecuada por medio de su dieta. Esto puede causar efectos graves en el feto o el bebé en desarrollo, algunos de los cuales pueden ser:

- Causar el nacimiento prematuro o excesivamente pequeño del bebé;
- Afectar el cerebro, los riñones y el sistema nervioso del bebé;
- Aumentar la probabilidad de problemas de aprendizaje y de comportamiento; y
- Colocar a la madre en riesgo de aborto.

3.3 Carga de morbilidad ¹

En la versión actualizada por la Organización Mundial de la Salud en 2021 de la publicación *Public health impact of chemicals: knowns and unknowns* se calcula que casi la mitad de los 2 millones de vidas perdidas por exposición a productos químicos conocidos se debieron a la exposición al plomo.

Se estima que la exposición al plomo provocó la pérdida de 21,7 millones de años por discapacidad y muerte (años de vida ajustados en función de la discapacidad o AVAD) en todo el mundo debido

a sus efectos a largo plazo en la salud, de los que un 30% corresponden a la carga mundial de discapacidad intelectual idiopática, un 4,6% a la carga mundial de enfermedades cardiovasculares y un 3% a la carga mundial de enfermedades renales crónicas.

3.4 Plomo en alimentos.

Acumulación de plomo en las plantas²

Para la mayoría de las especies de plantas, El plomo (aproximadamente 95% o más) se acumula en las raíces y sólo una pequeña fracción se transloca a partes aéreas de plantas, Aunque muchos metales presentan el fenómeno de restricción este fenómeno no es común a todos los metales pesados. Sin embargo, este fenómeno en las plantas es a la vez específico y muy intenso para plomo

Al entrar en la raíz, el plomo se mueve principalmente por el apoplasto y sigue corrientes de agua hasta llegar a la endodermis.

El transporte de metales desde las raíces de las plantas hasta los brotes requiere un movimiento a través del xilema y, cuando ocurre, probablemente sea impulsado por la transpiración demostraron una alta deposición de plomo en células del xilema y floema de plantas de mezquite mediante mapeo de rayos X. Después de penetrar en el cilindro central del vástago, el plomo puede ser transportado nuevamente a través de la vía apoplásica. Luego, el plomo se traslada a las áreas foliares a través de vías vasculares, véase dinámica de metales pesados figura N°2.

El transporte de metales desde las raíces de las plantas hasta los brotes requiere un movimiento a través del xilema y, cuando ocurre, probablemente sea impulsado por la transpiración demostraron una alta deposición de plomo en células del xilema y floema de plantas de mezquite mediante mapeo de rayos X. Después de penetrar en el cilindro central del vástago, el plomo puede ser transportado nuevamente a través de la vía apoplásica. Luego, el plomo se traslada a las áreas foliares a través de vías vasculares.

Los niños pequeños son particularmente vulnerables a la intoxicación por plomo porque, según la fuente de contaminación de que se trate, llegan a absorber una cantidad de plomo entre cuatro y cinco veces mayor que los adultos. Asimismo, su curiosidad innata y la costumbre, propia de su edad, de llevarse cosas a la boca los hacen más propensos a chupar y tragar objetos que contienen

plomo o que están recubiertos de este metal (por ejemplo, tierra o polvo contaminados o escamas de pintura con plomo).

Esta vía de exposición es aún mayor en los niños con un trastorno psicológico denominado pica (ansia persistente y compulsiva de ingerir sustancias no comestibles), quienes pueden arrancar y tragar escamas de pintura con plomo de las paredes, los marcos de las puertas o los muebles. En Nigeria, el Senegal y otros países, la exposición a tierra y polvo contaminados por plomo debido

al reciclaje de baterías y a actividades mineras ha provocado intoxicaciones masivas por plomo y numerosas muertes en niños pequeños⁸

Una vez dentro del cuerpo, el plomo se distribuye hasta alcanzar órganos como el cerebro, el hígado, los riñones y los huesos. Se deposita en dientes y huesos, donde se va acumulando con el paso del tiempo.

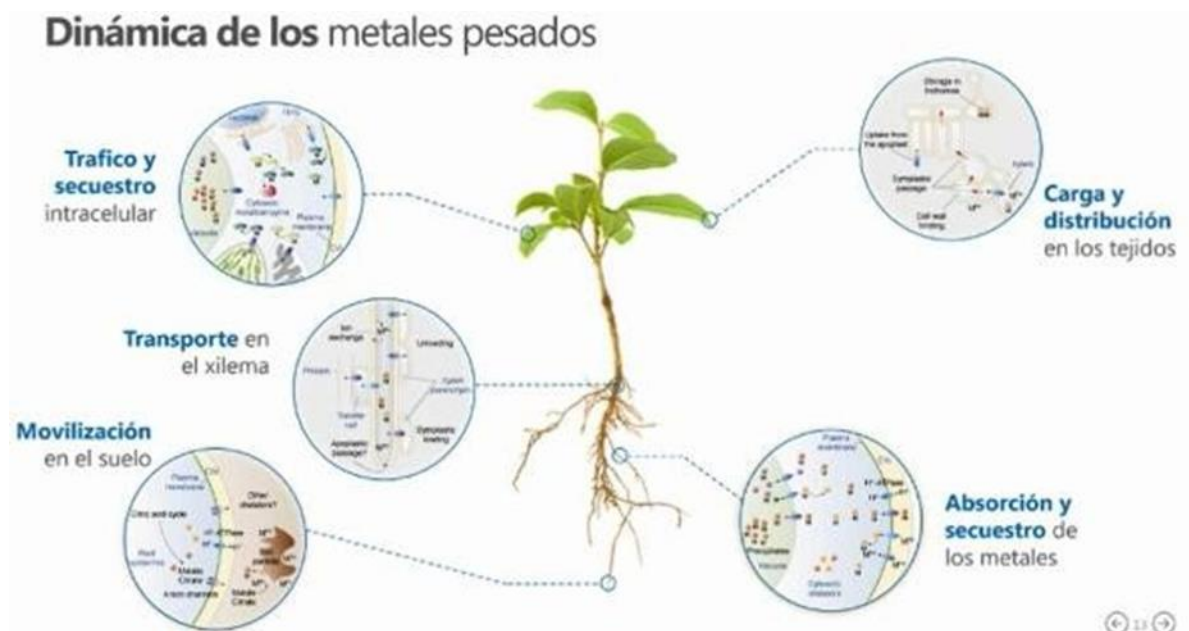


Figura N° 2. Dinámica de los metales pesados ⁸

3.5 Norma para confituras y jaleas según Codex ⁴

3.5.1 Definiciones del producto

Producto Definición

- Confitura

Es el producto preparado con fruta(s) entera(s) o en trozos, pulpa y/o puré de fruta(s) concentrado y/o sin concentrar, mezclado con productos alimentarios que confieren un sabor dulce con o sin la adición de agua y elaborado hasta adquirir una consistencia adecuada.

- Jalea

Es el producto preparado con el zumo (jugo) y/o extractos acuosos de una o más frutas, mezclado con productos alimentarios que confieren un sabor dulce, con o sin la adición de agua y elaborado hasta adquirir una consistencia gelatinosa semisólida.

- Mermelada de agrios

Es el producto preparado con una o una mezcla de frutas cítricas y elaborado hasta adquirir una consistencia adecuada. Puede ser preparado con uno o más de los siguientes ingredientes: fruta(s) entera(s) o en trozos, que pueden tener toda o parte de la cáscara eliminada, pulpa(s), puré(s), zumo(s) (jugo(s)), extractos acuosos y cáscara que están mezclados con productos alimentarios que confieren un sabor dulce con o sin la adición de agua.

- Mermelada sin frutos cítricos

Es el producto preparado por cocimiento de fruta(s) entera(s), en trozos o machacadas mezcladas con productos alimentarios que confieren un sabor dulce hasta obtener un producto semilíquido o espeso/viscoso.

- Mermelada tipo jalea

Es el producto descrito en la definición de mermelada de agrios de la que se le han eliminado todos los sólidos insolubles pero que puede o no contener una pequeña proporción de cáscara finamente cortada.

3.5.2. Criterios de calidad

3.5.2.1 Requisitos generales

El producto final deberá tener una consistencia gelatinosa adecuada, con el color y el sabor apropiados para el tipo o clase de fruta utilizada como ingrediente en la preparación de la mezcla, tomando en cuenta cualquier sabor impartido por ingredientes facultativos o por cualquier colorante permitido utilizado. El producto deberá estar exento de materiales defectuosos normalmente asociados con las frutas. En el caso de la jalea y la jalea “extra”, el producto deberá ser suficientemente claro o transparente.

3.5.3 Defectos y tolerancias para las confituras

Los productos regulados por las disposiciones de esta Norma deberán estar en su mayoría exentos de defectos tales como la presencia de materia vegetal como: cáscara o piel (si se declara como fruta pelada), huesos(carozo) y trozos de huesos (carozo) y materia mineral. En el caso de frutas del grupo de las moras, la granadilla y la pitahaya (fruta “dragón”), las semillas (pepitas) se considerarán como un componente natural de la fruta y no como un defecto a menos que el producto se presente como “sin semillas (pepitas)”

3.6 Contaminantes⁵

- Los productos a los que se aplican las disposiciones de la presente Norma deberán cumplir con los niveles máximos de la Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos (CXS 193-1995).
- Los productos a los que se aplican las disposiciones de la presente Norma deberán cumplir con los límites máximos de plaguicidas establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius.

Tabla N°1: Nivel máximo (nm) (mg/kg) de plomo en jaleas mermeladas y confituras según la norma general de contaminantes y toxinas presentes en los alimentos y piensos del Códex alimentarius ⁴

Nombre del producto básico / producto	Nivel máximo (NM) (mg /kg)	Porción del producto al que se le aplica	Notas/ observaciones
Confituras, jaleas y mermeladas.	0.4	----	La norma pertinente al Codex para productos CXS 296-2009 (solo para confituras y jaleas)

3.7 Determinación de plomo por horno de grafito

3.7.1 Absorción atómica por horno de grafito ⁶

Generalidades: Espectrofotometría de Absorción Atómica

Dentro de los métodos espectrofotométricos de análisis para identificar y cuantificar elementos presentes en distintas matrices, se encuentra la espectrometría óptica atómica, este método convierte elementos presentes en una muestra en átomos o iones elementales en estado gaseoso por medio de un proceso denominado atomización.

Los dos métodos más utilizados para lograr la atomización de la muestra incluyen la aplicación de una llama (empleada en la absorción atómica con llama, FAAS) o el uso de la energía electrotérmica horno de grafito. En la tabla N° 2 podemos ver las ventajas y desventajas que tiene cada una de las técnicas antes mencionadas.

En este apartado se describen las generalidades de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS), también llamada con atomización electrotrémica. En la figura N°1 podemos observar las partes del espectrofotómetro técnica horno de grafito.

La técnica de GFAAS permite bajar los límites de detección al rango de partes por billón (ppb) con una instrumentación relativamente sencilla y sin los esfuerzos y pérdidas de tiempo que conllevan las técnicas de extracción previa.

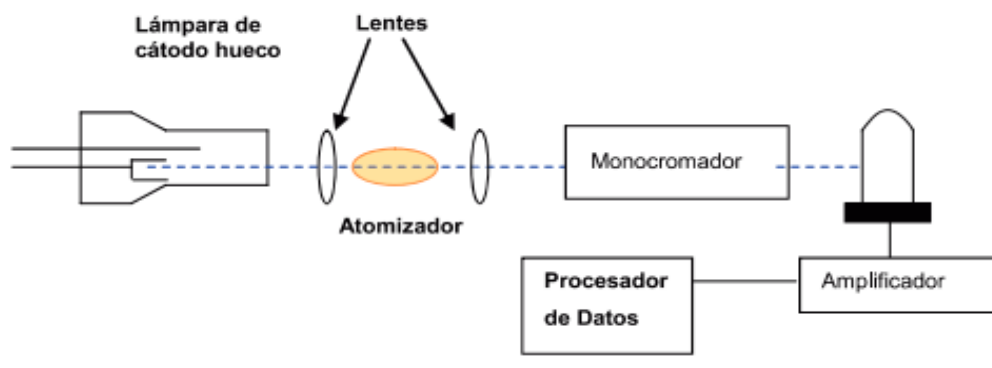


Figura N°2 Partes del espectrofotómetro técnica horno de grafito⁶

3.7.2 Fundamento teórico (GFAAS)

El principio del método se basa en la absorción de luz por parte de un elemento en estado atómico. La longitud de onda a la cual la luz es absorbida es específica de cada elemento. Se mide la atenuación de la intensidad de la luz como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente.

El método involucra fundamentalmente 2 procesos: la atomización de la muestra y la absorción de radiación proveniente de una fuente por los átomos libres. El tratamiento de la muestra hasta la atomización comprende las siguientes etapas:

-Secado:

Una vez que la muestra ha sido inyectada en el tubo de grafito, se calienta a una temperatura algo inferior al punto de ebullición del solvente (usualmente entre 80 a 180 °C). El objetivo de esta etapa es la evaporación del solvente. La muestra inyectada (2-20 µL) en el horno de grafito es sometida a una temperatura algo inferior al punto de ebullición del solvente (80-180 °C). Aquí se evapora el solvente y los componentes volátiles de la matriz.

-Calcinado:

El próximo paso del programa es el calcinado por incremento de la temperatura, para remover la mayor cantidad de material (materia orgánica) de la muestra como sea posible, sin pérdida del analito. La temperatura de calcinación usada varía típicamente en el rango de 350 a 1600 °C. Durante el calcinado, el material sólido es descompuesto mientras que los materiales refractarios, como por ejemplo los óxidos, permanecen inalterados.

-Atomización:

En esta etapa, el horno es calentado rápidamente a altas temperaturas (1800-2800 °C) para vaporizar los residuos del paso de calcinado. Este proceso lleva a la creación de átomos libres en el camino óptico. Se mide la absorbancia durante este paso.

La temperatura de atomización depende de la volatilidad del elemento.

Usualmente se agrega una cuarta etapa para limpieza del horno a una temperatura algo superior a la temperatura de atomización. Cuanto mejor sea la separación de los elementos concomitantes del analito, mejor será la atomización y la determinación estará más libre de interferencias.

Tabla N°2. Comparación de métodos: atomización por llama y por horno de grafito. ventajas y desventajas⁶

FAAS	GFAAS
la llama ofrece resultados en tiempos más cortos (3 a 5 segundos)	Los resultados aparecen en tiempos de 5 minutos

permite trabajar con volúmenes de muestra mayores	trabajar con volúmenes pequeños de muestras, y descender así a partes por billón los límites de detección para muestras biológicas y ambientales
y las interferencias que se presentan están a menudo bien documentadas	se observa la menor precisión y el mayor número de interferencias
mediante la adición de modificadores de matriz, lo que minimiza la etapa de preparación de muestra y la introducción de errores	Mayor sensibilidad

fuelle: elaboración propia

3.8 Método oficial AOAC 999.10⁷

3.8.1 Plomo, Cadmio, Zinc, Cobre y Hierro Espectrofotometría de absorción atómica en alimentos después de la digestión por microondas

Aplicable a la determinación de Zn, Cu y Fe en una variedad de alimentos siga las regulaciones locales, espectrofotometría (FAAS), Cd y Pb por digestión con microondas espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS). El método es capaz de determinar estos elementos en concentraciones Pb (0.1), Cd (0.01), Zn (4), Cu (0.2) y Fe (7) mg/kg El método no es aplicable a alimentos con un contenido de grasa $\geq 40\%$.

Principio: digestión de las muestras con HNO₃ y peróxido de hidrogeno calentado por microondas para el análisis de (GFAAS).

Equipos y materiales:

- Espectrofotómetro de absorción atómica. y un horno de grafito para electrotermia (GFAAS)
- Lámparas de descarga sin electrodos o de cátodo hueco. —Para Pb.
- Horno digestor microondas
- Recipientes de digestión de teflón.100 ml, soportando una presión de al menos 1,4 MPa

- Matraces aforados. 25 y 1000 ml
- Embudos. Vidrio o plástico
- Botellas de plástico. Por ejemplo, botellas de poliestireno con cierre hermético. tapas, 50 a 100 ml
- Horno de secado. —O equipo para liofilización
- Todo el material de vidrio y plástico debe limpiarse cuidadosamente y enjuagar con HNO₃ O HCL para evitar contaminación con el metal.

Reactivos: Los reactivos deben ser al menos de grado reactivo analítico (pa).

- Agua. Re destilada o desionizada, $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$
- Ácido nítrico. 65% (p/p).
- Ácido nítrico. 0,1 M. Diluir 7 ml de HNO₃ concentrado, con agua hasta 1 L.
- Ácido nítrico. 3M. Diluir 200 ml de HNO₃ concentrado, con agua hasta 1 L.
- Peróxido de hidrógeno. 30% (p/p).
- Solución estándar de plomo. 1 mg/ml Disolver 1.000 g de Pb en 7 ml de HNO₃, en un matraz aforado de 1 L y diluir a volumen con agua.

Digestión: Pese entre 0,2 y 0,5 g de material seco en el recipiente de digestión. Si se utilizan materiales que contienen agua, el peso máximo se limita a 2 g, pero el contenido de materia seca nunca debe exceder los 0,5 g.

Agregue 5 ml de HNO₃, y 2 ml de H₂O₂ al 30%. Cerrar vasos, coloque los recipientes en el soporte, coloque el soporte para recipientes en el horno microondas y cerrar la puerta.

Configure el horno digestor de microondas según tabla:

Tabla N°3. Configuración del digestor de microondas⁷

Paso	Potencia (vatios)	Duración (min)
1	250	3

2	630	5
3	500	22
4	0	15

El programa sólo es válido cuando se digieren 12 recipientes simultáneamente. Si se hacen menos, completar con blanco del reactivo.

Retire los recipientes del horno y déjelos enfriar. Posteriormente abra el recipiente, enjuague la tapa y el recipiente y trasladar a un matraz volumétrico de 25 ml llevar a aforo con agua desionizada y trasladar las muestras a un recipiente de plástico.

Si es necesario diluir las muestras por altas concentraciones hacerlo con HNO_3 3M.

Espectrofotometría de absorción atómica: Las mediciones deben estar dentro del rango lineal cuando el método de Se utiliza la adición estándar. Una curva de suma estándar consta de al menos 3 puntos, de los cuales al menos 2 son estándares. La concentración de El estándar más alto debe ser de 3 a 5 veces la concentración en la solución de prueba. El estándar inferior debe tener una concentración de aproximadamente la mitad del estándar más alto.

Tabla N°4. Parámetros instrumentales para GFAAS⁷

		Temperatura (°C) / retención de rampa (s)		
		Limpieza		
Metal	Longitud de onda	Paso de incineración	Paso de atomización	Paso a Paso (°C)
Pb	283.3	650/15-10	1900/0-4	2500

Técnica del horno de grafito: Esta técnica generalmente se requiere para la determinación de Pb y Cd en alimentos. Usar pirolíticamente Tubos revestidos con plataformas.

Programar el muestreador automático para que entregue un volumen que proporcione una absorbancia como sea posible dentro del rango lineal y produciendo una absorbancia de fondo no mayor que aproximadamente 0,5 absorbancia unidades. La inyección múltiple puede mejorar la absorbancia a concentraciones muy bajas. Evaluar cada nueva matriz mediante curvas de ceniza y atomización para optimizar los parámetros del horno de grafito. Ver parámetros instrumentales para absorción atómica por horno de grafito en tabla N°4.

3.9 Proceso de validación⁸

La validación de métodos analíticos fisicoquímicos es requisito el cual deben cumplir todos los laboratorios a nivel nacional internacional, es requerida en Normas sobre Sistemas de Gestión de la Calidad, sobre software y particularmente en la Norma ISO/IEC 17025:2005 sobre requisitos generales para laboratorios de calibración y ensayo. En nuestro país el organismo encargado es el ORGANISMO SALVADOREÑO DE ACREDITACIÓN (OSA) el cual proporciona una guía con los requisitos para la validación para poder así confirmar que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza y posteriormente obtener la acreditación otorgada por el mismo organismo.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos o parámetros definidos y para el propósito requerido (OSA).

La validación consta de 3 partes: protocolo de validación, proceso de validación e informe.

3.9. 1 el protocolo de validación

El protocolo debe ser fechado y firmado por los responsables de la validación o persona designada por el laboratorio y debe incluir como mínimo lo siguiente:

Identificación:

Se deberá de identificar de acuerdo al control interno de documentos definido por el laboratorio.

Objetivo:

Definir la finalidad del protocolo de validación. (Ej. Definir los parámetros a validar, las actividades necesarias para la realización de la validación del método XXX-YY-ZZ para la evaluación del analito EE por la técnica CFG)

Alcance:

Delimitación de tipo de muestra, matriz, analito, rango de concentración, técnica analítica.

Nota: Para muestras de alimento se deberá de utilizar la clasificación establecida en el RTCA 67.04.54:10 Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos alimentarios, para la definición de Matriz y número de muestras a validar según lo detallado en el apartado 7 “Sistema de Clasificación de los alimentos” de dicho reglamento, se dará por válido el alcance de la validación de acuerdo a lo siguiente:

Categoría de alimento:

Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación de al menos el 50% del total de sub categorías y de cada una de ellas 2 tipos de alimentos. (Si la subcategoría lo permite).

Nota: Para cualquier otro tipo de muestra, el OSA evaluará la aceptación de un grupo o categoría de matriz para establecer un alcance siempre y cuando se validen al menos 2 tipos de muestras para ese grupo o categoría, siempre que sea posible y basado en la normativa o a la bibliografía presentada por el laboratorio.

Para los casos en los que no existen Categorías o Sub categorías, el alcance estará definido por el tipo específico de muestra que se valida.

Responsables:

Equipo de validación: Definir e identificar con Nombre los analistas que realizan la validación, persona(s) que revisa(n) el informe de validación, persona(s) que autorizan el informe de validación.

Parámetros a estudiar y los correspondientes criterios de aceptación:

Establecer los parámetros a validar y su criterio de aceptación de acuerdo al tipo de referencia utilizada.

Muestras (matrices):

Se definirán los tipos de muestra, identificación.

Equipos, reactivos y materiales de referencia involucrados en la validación:

Detallar los equipos involucrados en la validación, así como la codificación interna que se ha asignado a cada uno. En cuanto a los reactivos y materiales de referencia utilizados, detallar lote, fecha de vencimiento y proveedor del mismo.

Referencia del método analítico a validar:

Detallar el nombre, versión, edición, año y cualquier otra información pertinente de las referencias utilizadas, que permita identificar el método a validar.

Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar:

Detallar claramente los parámetros que se han definido para realizar la validación, así como del procedimiento a seguir para la estimación de cada uno, en el cual incluyan como mínimo detalle de las pesadas a realizar, diluciones, análisis estadístico a aplicar y detalle del proceso a seguir para su determinación y los criterios de aceptación.

para poder iniciar con la validación es necesario conocer la clasificación del método al cual le vamos a realizar la validación, este puede ser:

- Método Normalizado: Se trata de un método de ensayo normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en referencias reconocidas internacionalmente. Ejemplos de referencias reconocidas: USP, FEUM, EP, BP, JP, IP, AOAC, Standard Methods, EPA, PAM, CIPAC, ASTM, ASHTO, ISO, Codex Alimentarius, FDA, FAO, CE, USDA, otras referencias serán evaluadas.
- Método Normalizado modificado: Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado. Ejemplos: un método de extracción diferente o la aplicación del método en una matriz diferente a la indicada, aplicación del método en rangos distintos trabajos.

- Método no normalizado: Se trata de un método de ensayo que no se encuentra en referencias reconocidas internacionalmente.

Según sea el método se evalúan los siguientes parámetros:

Selectividad/especificidad: la selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad de medir el analito de interés en muestras a la cuales se le agregan intencionalmente interferencias específicas (aquellas que se considere probable de encontrar en las muestras).

Tabla N°5: Selectividad/especificidad⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
1 muestra de ensayo y material de referencia	1	<p>Valuar la capacidad del método de identificar y medir el analito aislado.</p> <p>Se documentará la información complementaria que permita definir mejor la selectividad del analito de interés.</p>	<p>La respuesta del método debe ser únicamente debida al analito. Cualquier desviación encontrada no deberá ser mayor a los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio con respecto a la referencia normativa.</p> <p>Nota: Si la referencia del método establece la forma de evaluación de éste parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia</p>

Linealidad: El intervalo lineal es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

Tabla N°6: Linealidad⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Medir un blanco más Estándar de referencia esparcidos uniformemente en el rango de interés.	Se trabajarán 5 niveles como mínimo por triplicado, distribuidos uniformemente en el rango de interés	Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Calcular las estadísticas de regresión apropiadas, calcular y graficar los residuales (diferencia entre el valor observado de “y” y el valor calculado de “y” pronosticado por la línea recta, para cada valor de “x”). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza con el nivel.	<ul style="list-style-type: none"> - Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica. - Datos aleatorios en el gráfico de residuales. - El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva. <p>Criterios de aceptación</p> <p>Intervalo de trabajo</p> <p>$r \geq 0.98$ El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad.</p>

Exactitud: Para verificar la exactitud utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia.

Tabla N°7: Exactitud⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Se puede utilizar como muestra lo siguiente: - Material de referencia certificado. - Blanco adicionado. - Material de referencia. - Matriz adicionada. - Comparación con método oficial.	Se trabajarán 3 niveles como mínimo: - Bajo - Medio – Alto Nivel bajo y alto por triplicado. Y nivel medio sextuplicado. En los niveles seleccionados se debe incluir el rango de trabajo del método. (Ver intervalo de trabajo)	Determinar el valor de Sesgo, error relativo porcentual o recuperación	Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método y, caso contrario, se sugieren las tablas del anexo de la referencia AOAC Guideline for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002. Otras referencias podrán ser evaluadas.

Fórmulas a utilizar:

$$R (\%) = \frac{\bar{X}}{XREF} \times 100$$

R(%) = Recuperación aparente

\bar{X} = valor medio

XREF = Valor de referencia

Para el cálculo del parámetro de Exactitud utilizando matriz adicionada, se deberá tomar en cuenta la siguiente fórmula:

$$R^{\circ} (\%) = \frac{\bar{X} - X}{X_{Adicion}} \times 100$$

En donde: R' (%) es la recuperación relativa de adiciones a las diferentes concentraciones.

- Precisión: La precisión es medida mediante la repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia.
- Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Tabla N°8: Repetibilidad⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Se puede utilizar como muestra lo siguiente: -Material de referencia certificado - Blanco adicionado -Material de referencia -Matriz adicionada -Muestra natural con contenido de analito dentro del rango a validar.	Al menos tres niveles de concentración (Bajo, medio y alto) y realizar al menos 6 repeticiones en cada nivel bajo condiciones de Repetibilidad. Este parámetro deberá realizarse tomando en cuenta todo el proceso analítico para cada repetición.	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido.	Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método. Otras referencias podrán ser evaluadas

- Precisión intermedia: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio

Tabla N°9: Precisión⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Se puede utilizar como muestra lo siguiente: - Material de referencia certificado - Blanco adicionado - Material de referencia - Matriz adicionada - Muestra natural con contenido de analito dentro del rango a validar.	1 menos tres niveles de concentración (Bajo, medio y alto dentro del rango a validar) y realizar al menos 12 repeticiones en cada nivel bajo condiciones de precisión intermedia. 6 repeticiones por cada condición. Este parámetro deberá realizarse tomando en cuenta todo el proceso analítico para cada repetición.	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos	- Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método. Otras referencias podrán ser evaluadas

- Reproducibilidad: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. Esto aplica en caso de organizaciones con diferentes laboratorios y/o cuando se requiera transferir métodos. Este parámetro aplica a laboratorios que tienen sedes con las cuales poder compararse únicamente.

Tabla N°10: Reproducibilidad⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Se puede utilizar como muestra lo siguiente: - Material de referencia certificado - Blanco adicionado - Material de referencia - Matriz adicionada - Muestra natural con contenido de analito dentro del rango a validar.	Las condiciones del estudio de reproducibilidad deberán de ser plantadas por el laboratorio y aprobado por el OSA.	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos	- Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método. Otras referencias podrán ser evaluadas

Límite de detección: El límite de detección del instrumento puede basarse en el análisis de una muestra, usualmente un blanco de reactivo, sometido directamente al instrumento (es decir, omitiendo cualquier paso de preparación de muestra), o en la relación señal/ruido en p.ej. un cromatograma. Para obtener el límite de detección de un método, el LOD debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo.

Límite de cuantificación: El límite de Cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible)

Determinación de los límites de detección y cuantificación:

$$LD = 3.3 * Sb0 / m$$

$$LC = 10 * Sb0 / m$$

Tabla N°11: Límite de detección/ cuantificación⁸

Muestra	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Para métodos cuantitativos: 10 blancos de muestras independientes medidos una vez cada uno ó 10 blancos de muestras independientes fortificadas a la menor concentración aceptable medidos una vez cada uno.	Desviación estándar de la muestra s de: Valores de blanco de muestra ó Valores de los blancos de muestra fortificadas	Expresar límite de detección cómo la concentración del analito correspondiente a: a El valor promedio de los blancos de muestra + 3s ó $0 + 3s$ Expresar límite de cuantificación cómo: Valor promedio de las lecturas de los blancos + 6s ó + 10s. Cualquier otro factor de cobertura utilizado deberá de ser justificado en base a referencia bibliográfica. Si la referencia del método establece la forma de evaluación de este parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia.

Robustez: La “robustez” de un procedimiento analítico es "una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método.

Tabla N°12: Robustez⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método. Establecer experimentos (analizando MR o muestras de ensayo) para supervisar el efecto en los resultados de la medida cambiando de forma sistemática las variables	Evaluado más efectivamente utilizando diseños de experimentos. Verificar al menos 7 variables o parámetros utilizando un modelo de Youden.	Determinar el efecto de cada cambio de condición en los resultados de la medida. Clasificar las variables según el mayor efecto sobre el desempeño del método. Realizar pruebas de significación para determinar si los efectos observados son estadísticamente significativos.	Si la referencia del método establece la forma de evaluación de este parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia.

Incertidumbre: La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que- expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo.

Tabla N°13: Incertidumbre⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/Determinar	Criterio de aceptación
No Aplica	Utilizar la información obtenida en el proceso de confirmación o validación interna	Especificar el mensurando Identificar las fuentes de incertidumbre	Reportar la incertidumbre expandida con un factor de cobertura $k=2$ y un nivel de significancia del 95%.

		<p>Cuantificar los componentes de la incertidumbre (u)</p> <p>Calcular la incertidumbre estándar combinada (uc)</p> <p>Calcular la incertidumbre expandida (uexp)</p>	
--	--	---	--

Al finalizar la realización de los parámetros y obteniendo los resultados esperados se realiza el informe de validación.

3.10 Informe de validación

El informe de validación contendrá la información suficiente para poder concluir acerca de la validación

que se ha desarrollado.

Debe incluir:

- Hacer referencia al protocolo utilizado
- Parámetros validados y criterios de aceptación
- Resultados Analíticos
- Resultados Estadísticos
- Interpretación de resultados y/o conclusiones
- Cuadro resumen de los resultados obtenidos (parámetro, criterio, resultado y conclusión)
- Declaración de Aptitud del Método
- Datos crudos de la validación

Además, será autorizado por o las personas asignadas por el laboratorio.

CAPÍTULO IV

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Protocolo de validación

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	1 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

1. Objetivo

1.1 Establecer un protocolo para llevar a cabo la validación del método de cuantificación de plomo en jaleas, mermeladas y confituras por absorción atómica técnica horno de grafito.

2. Alcance

2.2 Para los alimentos de la categoría 04.1.2 Frutas elaboradas sub categoría 04.1.2.5 Confituras, jaleas, mermeladas. 4.0 mg/kg como máximo según la norma.

3. Responsables:

- Jefa del laboratorio de alimentos y toxicología.
- Asesor del proceso de validación.

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	2 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

- Persona a ejecutar la validación.

4. Parámetros a estudiar y los correspondientes criterios de aceptación

4.1 Parámetros a validar para métodos normalizados modificados:

- Linealidad.
- Exactitud.
- Precisión.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Incertidumbre.

5. Muestras:

- Confitura de BlackBerry.
- Confitura de fresa.
- Mermelada de naranja.
- Mermelada de fresa.

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	3 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

6. Equipos, reactivos y materiales de referencia involucrados en la validación:

- Equipos
- Horno de grafito
- Digestor de microondas
- Cabina de seguridad

Reactivos

- Estándar de plomo 1000 ppm ± 10
- Ácido nítrico 70-69%
- Peróxido de hidrogeno 30%
- Nitrato de paladio
- Magnesio
- Agua ultra pura

Material de referencia:

- Codex alimentarius
- Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA)

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	4 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

7- Referencia del método analítico a validar

AOAC 999.10: Plomo, Cadmio, Zinc, Cobre en alimentos por espectroscopia de absorción atómica (AAS) Después de la digestión por microondas.

8- Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar.

Linealidad:

Tabla N°14: Linealidad⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/ determinar	Comentario
Medir un blanco más Estándar de referencia esparcidos uniformemente en el rango de interés.	Medir un blanco más Estándar de referencia esparcidos uniformemente en el rango de interés.	Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Calcular las estadísticas de regresión apropiadas, calcular y graficar los residuales (diferencia entre el	Esta etapa es necesaria para ensayar un intervalo de trabajo, que se considere lineal y especialmente en el que el método utilice una calibración de dos puntos. Si la desviación estándar es proporcional a la concentración, entonces

		<p>valor observado de “y” y el valor calculado de “y” pronosticado por la línea recta, para cada valor de “x”). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza con el nivel.</p>	<p>considerar utilizar un cálculo de regresión ponderado en vez de una regresión lineal no ponderada simple. No se deben de eliminar valores atípicos sin verificarlo antes utilizando otras mediciones a concentraciones cercanas.</p>
<p>Medir, de acuerdo con el método documentado, un blanco más material de referencia o blancos de muestra adicionados esparcidos uniformemente en el rango de interés</p>	<p>Se trabajarán 5 niveles como mínimo por triplicado, distribuidos uniformemente en el rango de interés.</p>	<p>Graficar la concentración medida (eje y) en función de la concentración de las muestras de ensayo (eje x). Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de</p>	<p>Este paso se requiere para evaluar si el rango propuesto del instrumento y el procedimiento de calibración son aptos para el uso. Si pueden encontrarse datos en estudios de precisión y sesgo que cubren el rango de interés, quizás no se requiera otro estudio del intervalo de trabajo del método</p>

		<p>“y” y el valor calculado de “y” pronosticado por la línea recta, para cada valor de “x”). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad</p>	
--	--	---	--

Criterios de aceptación Intervalo lineal

- Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.
- Datos aleatorios en el gráfico de residuales.
- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva.
- Criterios de aceptación Intervalo de trabajo
- $r \geq 0.98$
- El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad.

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	5 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

Exactitud

Tabla N°15: Exactitud⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/ determinar	Comentario
<p>Se puede utilizar como muestra lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Material de referencia certificado. - Blanco adicionado. - Material de referencia. - Matriz adicionada. - Comparación con método oficial. 	<p>Se trabajarán 3 niveles como mínimo: - Bajo - Medio - Alto Nivel bajo y alto por triplicado. Y nivel medio sextuplicado. En los niveles seleccionados se debe incluir el rango de trabajo del método. (Ver intervalo de trabajo).</p>	<p>Determinar el valor de Sesgo, error relativo porcentual o recuperación</p>	<p>Reportar el intervalo de confianza del porcentaje de recobro</p>

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	8 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

Fórmulas:

$$b = \bar{x} - x_{Ref}$$

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{Ref}}{x_{Ref}} \times 100$$

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{Ref}} \times 100$$

En donde:

X - Valor medio

X ref= valor de referencia

b= Sesgo

b(%)= Error relativo porcentual

R(%)= Recuperación aparente.

Para el cálculo del parámetro de Exactitud utilizando matriz adicionada, se deberá tomar en cuenta las siguientes fórmulas:

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}}{x_{Adición}} \times 100$$

En donde: R' (%) es la recuperación relativa de adiciones a las diferentes concentraciones.

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	10 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

Criterio de aceptación: Se debe tomar en cuenta el método de referencia

Precisión: La precisión es medida mediante la repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia.

Tabla N°16: Precisión⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/ determinar	Comentario
Se puede utilizar como muestra lo siguiente: - Material de referencia certificado	Al menos tres niveles de concentración (Bajo, medio y alto) y realizar al menos 6 repeticiones en cada nivel bajo condiciones de Repetibilidad. Este parámetro deberá realizarse tomando en cuenta todo el proceso analítico para cada repetición	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido. Si la referencia tiene otro estadístico de dispersión, justificar su uso.	Determina la Repetibilidad.

<ul style="list-style-type: none"> - Blanco adicionado - Material de referencia - Matriz adicionada - Muestra natural con contenido de analito dentro del rango a validar 	<p>Al menos tres niveles de concentración (Bajo, medio y alto dentro del rango a validar) y realizar al menos 12 repeticiones en cada nivel bajo condiciones de precisión intermedia. 6 repeticiones por cada condición. Este parámetro deberá realizarse tomando en cuenta todo el proceso analítico para cada repetición.</p>	<p>Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos.</p> <p>Si la referencia tiene otro estadístico de dispersión, justificar su uso.</p>	<p>Determina la precisión intermedia.</p>
	<p>Las condiciones del estudio de reproducibilidad deberán de ser plantadas por el laboratorio y aprobado por el OSA.</p>	<p>Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos de los laboratorios</p>	<p>Determina la reproducibilidad</p>

Criterio de aceptación: Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método. Otras referencias podrán ser evaluadas.

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	11 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

Límite de Detección y Límite de Cuantificación:

Tabla N°17: Limite de detección/ cuantificación⁸

Repeticiones	Calcular/Determinar	Comentarios
Para métodos cuantitativos: 10 blancos de muestras independientes medidos una vez cada uno ó 10 blancos de muestras independientes fortificadas a la menor concentración aceptable medidos una vez cada uno	Desviación estándar de la muestra s de: - Valores de blanco de muestra ó - Valores de los blancos de muestra fortificadas	Expresar límite de detección cómo la concentración del analito correspondiente a: - El valor promedio de los blancos de muestra + 3s ó - 0 + 3s Expresar límite de cuantificación cómo: Valor promedio de las lecturas de los blancos + 6s ó + 10s. Cualquier otro factor de cobertura utilizado deberá de ser justificado en base a referencia bibliográfica

Fecha	Responsable	Página:
28-04-2023	Daniela Beatriz Alonzo Romero	13 de 13
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO EN JALEAS, MERMELADAS Y CONFITURAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA TECNICA HORNO DE GRAFITO		

Tabla N°18: Incertidumbre⁸

Muestra	Repeticiones	Calcular/ Determinar	Comentarios
No Aplica	Utilizar la información obtenida en el proceso de confirmación o validación interna	<ul style="list-style-type: none"> - Especificar el mensurando - Identificar las fuentes de incertidumbre - Cuantificar los componentes de la incertidumbre (u) - Calcular la incertidumbre estándar combinada (uc) - Calcular la incertidumbre expandida (uexp) 	Reportar la incertidumbre expandida con un factor de cobertura $k=2$ y un nivel de significancia del 95%

4.2 Proceso de validación

Tabla N°19: Proceso de validación.

Área o Departamento	Periodo (Fechas)	No	ACTIVIDAD
Oficina de Jefatura	20 de marzo – 14 de abril	1	Lectura de procedimientos normas y reglamentos internos del laboratorio de Alimentos y Toxicología Norma Técnica Salvadoreña ISO/IEC 17025.2017 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. Firma de acuerdos de confidencialidad y imparcialidad
Toxicología	17 de abril – 3 de mayo	2	Lectura y capacitación en instrucciones técnicas y metodologías de la plataforma de toxicología
		3	Capacitación e inducción a las buenas prácticas de laboratorio
	4 de mayo – 19 de mayo	4	Asignación y delimitación del proyecto a desarrollar. Revisión bibliográfica y asesoría del tutor externo para la elaboración del plan de trabajo de las PPS.
		5	Realización del protocolo de validación
		6	Elección de matrices a validar
		7	Preparación de muestras y fortificación con concentraciones conocidas matriz 1 y Digestión de la muestra
	22 de mayo – 5 de junio	8	Análisis de muestra por espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito/ validación
	de junio 6 – 19 de junio	9	Preparación de muestras y fortificación con concentraciones conocidas matriz 2 y Digestión de la muestra
	20 de junio – 3 de julio	10	Análisis de muestra por espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito/ validación
	4 de julio – 18 de julio	11	Preparación de muestras y fortificación con concentraciones conocidas matriz 3 y Digestión de la muestra
	19 julio – 7 de agosto	12	Análisis de muestra por espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito/ validación
	8 de agosto – 17 de agosto	12	Preparación de muestras y fortificación con concentraciones conocidas matriz 4 y Digestión de la muestra
	18 de agosto – 1 de septiembre	14	Análisis de muestra por espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito / validación
	4 de septiembre – 20 de septiembre	15	Realización del informe de validación para cada matriz

Fuente: Elaboración propia

4.3 Resumen del informe de validación

Tabla N°20 Mx1. Mermelada de naranja

Cuadro resumen

Parámetro evaluado	Limite establecido	Resultado obtenido	Observación
-Linealidad			
Intervalo Lineal			
Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo del intercepto	Debe contener el valor cero	Contiene el valor cero	Cumple
-Intervalo de Trabajo			
Coficiente de determinación	≥ 0.98	0.9969	Cumple
Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo de la pendiente	Debe contener el valor uno	Contiene el valor uno	Cumple
Límite inferior del Intervalo	LCM	0.2152 mg/Kg	
Límite Superior del Intervalo	Concentración a Máxima Abs	3.6227 mg/Kg	
-Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel 1 Analista 1	0.8 a 1.2	0.8 1.0	Cumple
Nivel 1 Analista 2	0.8 a 1.2	0.8 0.9	Cumple
Nivel 2 Analista 1	0.8 a 1.2	1.0 1.0	Cumple
Nivel 2 Analista 2	0.8 a 1.2	1.0 1.0	Cumple
Nivel 3 Analista 1	0.8 a 1.2	0.9 0.9	Cumple
Nivel 3 Analista 2	0.8 a 1.2	0.8 0.9	Cumple
-Precisión intermedia como CV			
Nivel 1	$\leq 20\%$	7.21	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	1.31	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.49	Cumple
-Repetibilidad como CV			
Analista 1 Nivel 1	$\leq 20\%$	2.20	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.42	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.09	Cumple
Analista 2 Nivel 1	$\leq 20\%$	3.40	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.62	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.21	Cumple
-Incertidumbre del resultado a reportar	$\leq 30\%$	Todos los valores \geq LCM tienen Incert. $\leq 30\%$	Cumple
-Lím. de Detección del Método (LDM)	≤ 0.25 mg/Kg	0.0646 mg/Kg	Cumple
-Lím. de Cuantific. del Método (LCM)	≤ 0.75 mg/Kg	0.2152 mg/Kg	Cumple

Discusión de resultados: cumple con los parámetros de calidad

TablaN°21: Mx2. Mermelada de fresa

Cuadro resumen

Parámetro evaluado	Limite establecido	Resultado obtenido	Observación
-Linealidad			
Intervalo Lineal			
Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo del intercepto	Debe contener el valor cero	Contiene el valor cero	Cumple
-Intervalo de Trabajo			
Coefficiente de determinación	≥ 0.98	0.9953	Cumple
Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo de la pendiente	Debe contener el valor uno	Contiene el valor uno	Cumple
Límite inferior del Intervalo	LCM	0.1296 mg/Kg	
Límite Superior del Intervalo	Concentración a Máxima Abs	3.4363 mg/Kg	
-Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel 1 Analista 1	0.8 a 1.2	0.7 1.0	Cumple
Nivel 1 Analista 2	0.8 a 1.2	0.8 0.9	Cumple
Nivel 2 Analista 1	0.8 a 1.2	0.8 0.9	Cumple
Nivel 2 Analista 2	0.8 a 1.2	0.9 0.9	Cumple
Nivel 3 Analista 1	0.8 a 1.2	0.7 0.8	Cumple
Nivel 3 Analista 2	0.8 a 1.2	0.8 0.9	Cumple
-Precisión intermedia como CV			
Nivel 1	$\leq 20\%$	4.60	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	3.18	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	13.39	Cumple
-Repetibilidad como CV			
Analista 1 Nivel 1	$\leq 20\%$	2.46	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	1.01	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.93	Cumple
Analista 2 Nivel 1	$\leq 20\%$	0.94	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.19	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.62	Cumple
-Incertidumbre del resultado a reportar	$\leq 30\%$	Todos los valores \geq LCM tienen Incert. $\leq 30\%$	Cumple
Lím. de Detección del Método (LDM)	≤ 0.25 mg/Kg	0.0389 mg/Kg	Cumple
Lím. de Cuantific. del Método (LCM)	≤ 0.75 mg/Kg	0.1296 mg/Kg	Cumple

Discusión de resultados MX2: cumple con los parámetros de calidad

TablaN°22: Mx3. Confitura de fresa

Cuadro resumen

Parámetro evaluado	Limite establecido	Resultado obtenido	Observación
-Linealidad			
Intervalo Lineal			
Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo del intercepto	Debe contener el valor cero	Contiene el valor cero	Cumple
-Intervalo de Trabajo			
Coefficiente de determinación	≥ 0.98	0.9988	Cumple
Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo de la pendiente	Debe contener el valor uno	Contiene el valor uno	Cumple
Límite inferior del Intervalo	LCM	0.1410 mg/Kg	
Límite Superior del Intervalo	Concentración a Máxima Abs	3.2891 mg/Kg	
-Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel 1 Analista 1	0.8 a 1.2	0.8 1.1	Cumple
Nivel 1 Analista 2	0.8 a 1.2	0.9 1.0	Cumple
Nivel 2 Analista 1	0.8 a 1.2	1.1 1.1	Cumple
Nivel 2 Analista 2	0.8 a 1.2	1.0 1.0	Cumple
Nivel 3 Analista 1	0.8 a 1.2	0.9 1.0	Cumple
Nivel 3 Analista 2	0.8 a 1.2	1.0 1.0	Cumple
-Precisión intermedia como CV			
Nivel 1	$\leq 20\%$	7.97	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	6.54	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	1.87	Cumple
-Repetibilidad como CV			
Analista 1			
Nivel 1	$\leq 20\%$	2.01	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.54	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.17	Cumple
Analista 2			
Nivel 1	$\leq 20\%$	1.09	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.57	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.14	Cumple
-Incertidumbre del resultado a reportar	$\leq 30\%$	Todos los valores \geq LCM tienen Incert. $\leq 30\%$	Cumple
-Lím. de Detección del Método (LDM)	≤ 0.25 mg/Kg	0.0423 mg/Kg	Cumple
-Lím. de Cuantific. del Método (LCM)	≤ 0.75 mg/Kg	0.1410 mg/Kg	Cumple

Discusión de resultados MX3: cumple con los parámetros de calidad

Tabla N°23. Confitura de blue Berry

Cuadro resumen

Parámetro evaluado	Límite establecido	Resultado obtenido	Observación
-Linealidad			
Intervalo Lineal Residuales	Aleatorios.	Aleatorios.	Cumple
Intervalo del intercepto	Debe contener el valor cero	Contiene el valor cero	Cumple
-Intervalo de Trabajo			
Coefficiente de determinación Residuales	≥ 0.98 Aleatorios.	0.9966 Aleatorios.	Cumple Cumple
Intervalo de la pendiente	Debe contener el valor uno	Contiene el valor uno	Cumple
Límite inferior del Intervalo	LCM	0.0914 mg/Kg	
Límite Superior del Intervalo	Concentración a Máxima Abs	3.4988 mg/Kg	
-Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel 1 Analista 1	0.8 a 1.2	0.7 0.8	Cumple
Nivel 1 Analista 2	0.8 a 1.2	0.7 0.9	Cumple
Nivel 2 Analista 1	0.8 a 1.2	1.0 1.1	Cumple
Nivel 2 Analista 2	0.8 a 1.2	1.0 1.0	Cumple
Nivel 3 Analista 1	0.8 a 1.2	0.9 1.0	Cumple
Nivel 3 Analista 2	0.8 a 1.2	0.9 1.0	Cumple
Precisión intermedia como CV			
Nivel 1	$\leq 20\%$	7.21	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	4.70	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	4.18	Cumple
Repetibilidad como CV			
Analista 1 Nivel 1	$\leq 20\%$	1.32	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.56	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.82	Cumple
Analista 2 Nivel 1	$\leq 20\%$	0.86	Cumple
Nivel 2	$\leq 20\%$	0.59	Cumple
Nivel 3	$\leq 20\%$	0.51	Cumple
Incertidumbre del resultado a reportar	$\leq 30\%$	Todos los valores \geq LCM tienen Incert. $\leq 30\%$	Cumple
Lím. de Detección del Método (LDM)	\leq 0.25mg/Kg	0.0274 mg/Kg	Cumple
Lím. de Cuantific. del Método (LCM)	≤ 0.75 mg/Kg	0.0914 mg/Kg	Cumple

Discusión de resultados MX4: cumple con los parámetros de calidad.

CAPÍTULO V

5.0 CONCLUSIONES

1. Se elaboró el protocolo de validación en donde se detalló el proceso de validación y cada uno de los parámetros a validar el cual nos sirvió como guía en todo el proceso de la validación del método.
2. El proceso de validación realizado para la cuantificación de plomo en jaleas confituras y mermeladas fue exitoso, se evaluó cada uno de los parámetros de desempeño requeridos (linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión, e incertidumbre).
3. Los resultados obtenidos en el informe de validación confirman que se cumple con los parámetros y criterios de aceptación establecidos en Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos (G9.6) del Organismo de Acreditación Salvadoreño (OSA), por lo tanto, el método puede ser utilizado para el fin previsto.

CAPÍTULO VI

6.0 RECOMENDACIONES

1. A los productores de frutas y verduras hacer periódicamente análisis a los suelos y al agua de riego utilizada para cultivo a manera de evitar obtener cosechas contaminadas con plomo.
2. A la Universidad de El Salvador realizar más investigaciones sobre contaminación de plomo en alimentos.
3. A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia realizar gestiones para la adquisición de un equipo de Absorción Atómica y de esta manera capacitar a los estudiantes en la utilización del equipo y realizar futuras investigaciones.
4. Al Ministerio de Salud informar a la población en general la peligrosidad de la exposición a los metales estando alerta a cada uno de los síntomas de intoxicación y como estos pueden llegar al organismo humano.
5. Al Laboratorio de Alimentos y Toxicología realizar más análisis de vigilancia de metales como el plomo en productos alimenticios que son comercializados en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De la salud OM. Intoxicación por plomo y salud [Internet]. Who.int. 31 de agosto de 2022 [citado el 3 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>.
2. Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* [Internet]. 2011;213:113–36. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4
3. Scientific publications [Internet]. Cdc.gov. 2022 [citado el 15 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.cdc.gov/nceh/lead/rpublications.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fnceh%2Flead%2Fpublications%2Fdefault.htm
4. Codex alimentarius jaleas - Google Search [Internet]. Google.com. [citado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.google.com/search?q=codex+alimentarius+jaleas&rlz=1C1GCEA_enSV931SV931&oq=codex+alimentarius+jaleas&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEUUYOTIICAEQABgWGB7SAQkxMDkxMWowajeoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-8
5. NORMA GENERAL PARA LOS CONTAMINANTES Y LAS TOXINAS PRESENTES EN LOS ALIMENTOS Y PIENSOS [Internet]. Fao.org. 2019 [citado el 19 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.fao.org/faowhocodexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf
6. Díaz NMGC. CAPÍTULO 5. ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO. En: Farías LA, editor. *METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN Y ESPECIACIÓN DE AS EN AGUAS Y SUELOS*. p. 79–86.

7. de Boves Harrington Don Gilliland Adam J. Kuszak Katerina Mastovska Salvatore Parisi Andrew Turner Tomasz Tuzimski Guodong Zhang BGJMBKBACMCSJDP. Official Methods of Analysis – Revisions to 21st Edition. 2275 Research Blvd, Ste 300 Rockville, MD 20850: AOAC INTERNATIONAL; 2019.

8. de Acreditación OS. SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD G 9.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS FISICOQUÍMICOS VERSIÓN 2 APROBADO 2017/05/23. 2017 otoño.