



Casa abierta al tiempo

**Estudio bibliográfico sobre el desarrollo y validación de los métodos analíticos
empleados para la cuantificación de cadmio.**

Proyecto Genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

**Etapas: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico,
biológico y/o microbiológico de productos relacionados con la salud**

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Alumna: Elisa Deyaneira Valdez Mejía

Matrícula: 2173025531

Vo. Bo. De los asesores respecto a los contenidos académicos

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Asesor interno

No. Económico. 16190

Dra. Betzabeth Anali García Martínez

Asesor externo

No. Económico. 43790

Índice

Introducción	3
Objetivos	3
Metodología	4
Resultados y meta alcanzada	4
Conclusiones	4
Perspectiva	5
Bibliografía	5
Anexo 1	6

Introducción

Los metales pesados, como cadmio, se distribuyen en suelo, aire y agua (1–4). Anteriormente estos se encontraban en concentraciones que no perjudicaban las diferentes formas de vida, sin embargo, hoy en día dichas concentraciones han aumentado considerablemente debido a fuentes antropogénicas principalmente (4,7–9).

Este incremento en las concentraciones de cadmio en el ambiente ocasiona que el ser humano se encuentre más expuesto a absorber dicho metal, ya sea por ingestión o inhalación, lo que puede tener efectos nocivos a la salud, tales como enfermedades respiratorias, efectos negativos en los riñones, el tejido óseo, el sistema nervioso y también es considerado un agente carcinógeno (10–13).

Actualmente en México, la presencia de cadmio tanto en el ambiente como en el organismo no se encuentra bien regulada, sin embargo, al estar más expuestos al metal y a los problemas de salud del mismo, es necesario realizar la detección y cuantificación de cadmio mediante los diferentes métodos para monitorear su presencia. Dentro de los métodos más comúnmente usadas se encuentran la espectroscopia de emisión atómica, la espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente, voltamperometría de redisolución anódica, fluorescencia de rayos X y la espectrofotometría de absorción atómica (14–17)

Una vez desarrollado el método de cuantificación no es posible emplearlo inmediatamente para la determinación de cadmio, previamente se debe realizar una evaluación al mismo mediante estudios de laboratorio, para asegurarse de que produce resultados coherentes con el objetivo previsto y que sean fiables, es decir, el método debe ser validado (18–22).

Debido a lo anterior, en esta investigación se realizó una revisión bibliográfica sobre el desarrollo y validación de los diferentes métodos analíticos para la cuantificación de cadmio, enfatizando en la técnica por espectrofotometría de absorción atómica debido a su alta sensibilidad que permite analizar cantidades traza de muestra. Así mismo se realizó una propuesta de protocolo de validación para aplicar los conceptos aprendidos durante la revisión.

Objetivos

General:

- Elaborar una revisión bibliográfica mediante bases de datos sobre el desarrollo y validación de los diferentes métodos analíticos para la cuantificación de cadmio.

Particulares:

- Investigar y recopilar información de la importancia de la cuantificación de metales a partir de revistas electrónicas y bases de datos para denotar la importancia de la toxicidad que pueden presentar.
- Revisar y comparar a partir de fuentes bibliográficas los diferentes métodos analíticos más utilizados para cuantificación de Cadmio.

- Investigar sobre la importancia de la validación de métodos analíticos mediante bibliografía recopilada para verificar que se cumplen con los requisitos para su aplicación analítica.
- Recopilar y analizar información a partir de bitácoras y métodos desarrollados las condiciones analíticas empleadas para la cuantificación de cadmio.
- Determinar cuáles son los parámetros de desempeño y criterios de aceptación para llevar a cabo una validación de cadmio en matriz biológica a través de absorción atómica.

Metodología

Para el desarrollo de la presente investigación se realizó una recopilación de información en bases de datos en inglés y en español como PubMed, Google Scholar, Elsevier, en las que se ingresaron palabras clave como: “cadmio”, “distribución de cadmio”, “cadmio en ambiente”, “efectos de cadmio en la salud”, “cadmio como carcinógeno”, “cadmio y sistema nervioso”, “métodos de cuantificación de cadmio” “cuantificación de cadmio por espectrofotometría de absorción atómica” “espectroscopia de absorción atómica (EAA)”, “metales GF-AAS”, “validación de métodos”, “validación”.

Una vez realizada la búsqueda se seleccionaron los artículos, libros, tesis y páginas que contuvieran la información más relevante para cada sección de la revisión bibliográfica y se redactó con la información seleccionada.

Posteriormente, con los conceptos aprendidos durante el desarrollo de la revisión, se realizó una propuesta de protocolo de validación y de condiciones de cuantificación de cadmio por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito.

Resultados y meta alcanzada

En los anexos del presente informe se muestra la revisión bibliográfica realizada a partir de 101 artículos de investigación, de los cuales se obtuvo información sobre la distribución del cadmio en el ambiente, así mismo se mencionaron algunos de los efectos que este metal puede generar en la salud humana y los distintos métodos de cuantificación de cadmio y la validación de los mismos. Posteriormente se encuentra la propuesta de protocolo de validación dónde se menciona cómo desarrollar la validación del método de cuantificación de cadmio por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

Conclusiones

Debido a que el cadmio es un metal que está distribuido ampliamente en el ambiente y puede tener efectos graves en la salud, debe ser monitoreado tanto en las personas como en el ambiente. Para realizar dicho monitoreo, es necesario desarrollar métodos adecuados que se adapten a las necesidades del estudio a realizar y los recursos con los que se cuente, así como establecer los parámetros adecuados. Una vez que se ha desarrollado el método es necesario realizar la validación del mismo para asegurar que el método y los resultados obtenidos son fiables, ya que dichos resultados pueden derivar en un mal diagnóstico a un paciente o en sanciones económicas muy costosas por lo que es importante hacer un análisis correcto y ser capaz de demostrar que los resultados obtenidos son fiables.

Perspectiva

Una vez realizada la presente investigación se espera que se evalúe la propuesta de los parámetros para la cuantificación de cadmio por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, así como la evaluación y ejecución del protocolo de validación de dicho método.

Bibliografía

1. Delgado C, Bautista F, Gogichaishvili A, Cortés JL, Quintana P, Aguilar D, et al. Identificación de las zonas contaminadas con metales pesados en el polvo urbano de la Ciudad de México. *Revista internacional de contaminación ambiental* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 31];35(1):81–100.
2. Castresana GP, Roldán EC, Suastegui WAG, Perales JLM, Montalvo AC, Silva AH. Evaluation of Health Risks Due to Heavy Metals in a Rural Population Exposed to Atoyac River Pollution in Puebla, Mexico. *Water* 2019, Vol 11, Page 277 [Internet]. 2019 Feb 5 [cited 2022 Mar 31];11(2):277.
3. Campos OG, Ortega ML, González RC. Bioacumulación de Cadmio (Cd) en *Neiritina reclinata* de acuerdo a la NOM-029-SSA1-1996, en el Sistema Lagunar Tampamachoco, Veracruz, México. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan* [Internet]. 2013 Jul 21 [cited 2022 Mar 31];1(1):16–23.
4. Li F, Cai Y, Zhang J. Spatial Characteristics, Health Risk Assessment and Sustainable Management of Heavy Metals and Metalloids in Soils from Central China. *Sustainability* 2018, Vol 10, Page 91 [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2022 Mar 31];10(1):91.
5. Humberto Sepúlveda C, Ulloa Gómez MG, Góngora Gómez AM. Contenido de metales pesados (cobre, cromo, cadmio, níquel, plomo, arsénico, zinc y mercurio) en la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) de Bahía Altata, Sinaloa, y el riesgo potencial para la salud humana por su consumo [Internet]. [Ciudad de México]; 2018 [cited 2022 Mar 31].
6. Soria Mejía OI, Mastrocola Racines NA. Determinación de la presencia de metales pesados en tres vegetales Cadet, Tumbaco-Pichincha [Internet]. [Ecuador]; 2020 [cited 2022 Mar 31].
7. Núñez Nogueira G, Fernández Bringas LM. Efecto del lixiviado de manglar en la toxicidad de níquel y camio en el camarón estuarino (*Hippolyte zostericola*) de la Laguna de Términos, Campeche. *Kuxulkab'* [Internet]. 2018 Sep 13 [cited 2022 Mar 31];24(48):17–30.
8. Castro-González NP, Calderón-Sánchez F, Moreno-Rojas R, Tamariz-Flores JV, Reyes-Cervantes E. Heavy metals pollution level in wastewater and soils in the alto balsas sub-basin in tlaxcala and puebla, Mexico. *Revista internacional de contaminación ambiental* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 31];35(2):335–48.

9. Neira-Moscoso C, Rojas-Sánchez JM, Rodas-Espinoza C. Metales Pesados [Internet]. Vol. 66, Azuay. Ecuador : Universidad de Azuay; 2021 [cited 2022 Mar 31].
10. Fatima G, Raza AM, Hadi N, Nigam N, Mahdi AA. Cadmium in Human Diseases: It's More than Just a Mere Metal. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2019 34:4 [Internet]. 2019 Jun 27 [cited 2022 Mar 31];34(4):371–8.
11. Aguilera A, Bautista F, Gutiérrez-Ruiz M, Cenicerós-Gómez AE, Cejudo R, Goguitchaichvili A. Heavy metal pollution of street dust in the largest city of Mexico, sources and health risk assessment. *Environ Monit Assess* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Mar 31];193(4).
12. Kalubula M, Shen H, Khanam T. Assessment of carcinogenic and toxic substances in 'Insunko' herb. *Toxicology Reports*. 2020 Jan 1;7:468–74.
13. Sall ML, Diaw AKD, Gningue-Sall D, Efremova Aaron S, Aaron JJ. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Mar 31];27(24):29927–42.
14. Martínez-Toledo Á, Montes-Rocha A, González-Mille DJ, Espinosa-Reyes G, Torres-Dosal A, Mejía-Saavedra JJ, et al. Evaluation of enzyme activities in long-term polluted soils with mine tailing deposits of San Luis Potosí, México. *Journal of Soils and Sediments*. 2017 Feb 1;17(2):364–75.
15. Ceyca-Contreras JP, Cortés-Gutiérrez EI, García-Salas JA, Dávila-Rodríguez MI, García-Hernández J. Evaluation of the genotoxic effect of heavy metals in pigeons from urban and rural habitat in Monterrey, Mexico, using the chromatin dispersion assay. *Biomarkers* [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 31];25(8):670–6.
16. Numa Pompilio CG, Francisco CS, Marco Tulio F de MT, Sergio Samuel SM, Fernanda Eliza GJ. Heavy metals in blood, milk and cow's urine reared in irrigated areas with wastewater. *Heliyon* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Mar 31];7(4).
17. Torres-Sánchez L, Vázquez-Salas RA, Vite A, Galván-Portillo M, Cebrián ME, Macías-Jiménez AP, et al. Blood cadmium determinants among males over forty living in Mexico City. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Mar 31];637–638:686–94.
18. Pazmiño Salazar EM, Cevallos Raza MG. Desarrollo e implementación de un método para la determinación de plomo por absorción atómica en horno de grafito en agua natural y potable en el L3C-EPMAPS [Internet]. [Quito]: Universidad Central del Ecuador; 2017 [cited 2022 Apr 3].
19. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. [Internet]. UNODC. Nueva York: UNODC; 2010 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–76.

20. Ministerio de Salud. GUIA DE VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS [Internet]. Vol. 1, Ministerio de Salud. Ministerio de Salud; [cited 2022 Apr 6]. p. 1–18.
21. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Internet]. EMEA. London: EMEA; 1995 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–15.
22. Colegio Nacional de Químico Farmacéuticos Biólogos México. Guía de validación de Métodos Analíticos. Ciudad de México; 2002.

Anexo 1. Revisión bibliográfica

Estudio bibliográfico sobre el desarrollo y validación de los métodos analíticos empleados para la cuantificación de cadmio.

Literature review about the development and validation of analytical methods used for the quantification of cadmium.

Elisa Deyaneira Valdez Mejía¹, Jocelyn Sánchez Jiménez¹, Luis Camilo Ríos Castañeda¹, Betzabeth Analí García Martínez¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX.

Resumen

El cadmio se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente por lo que los seres humanos se encuentran en constante exposición al mismo. Este metal tiene diversos efectos negativos en la salud, por este motivo es de suma importancia monitorear su presencia tanto en el ambiente como en el organismo. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue realizar una revisión bibliográfica sobre los diferentes métodos para la cuantificación de cadmio, enfocándose principalmente en la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito. Adicionalmente se realizó una recopilación de información sobre la validación de los métodos analíticos y su importancia. Finalmente, una vez analizada la información obtenida se llegó a la conclusión de que se debe elegir un método que se adapte de mejor manera tanto al estudio a realizar como a los recursos con los que se cuente y una vez elegido, se debe ejecutar una validación que avale que el método es adecuado y los resultados son confiables.

Abstract

Cadmium is widely distributed in the environment so human beings are constantly exposed to it. This metal causes various negative effects on health, for this reason it is extremely important to monitor its presence in the environment and in the body., the aim of this research was to carry out a bibliographical review about the several quantification methods of cadmium, focusing mainly on the Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry technique. Additionally a compilation of information was carried out about the validation of the analytical methods and their importance. Finally, once the information obtained was analyzed, it was concluded that a method should be chosen that best suits the study to be carried out and the resources available, and once chosen, a validation should be carried out. that guarantees that the method is adequate, and the results are reliable.

Palabras clave: cadmio, cuantificación, absorción atómica, validación.

Keywords: cadmium, quantification, atomic absorption, validation

.1. Origen y distribución de Cadmio

Los metales pesados son considerados una de las principales fuentes de contaminación del suelo, aire y agua (1–4), estos están presentes de forma natural en la corteza terrestre debido a la actividad volcánica, tectónica, erosión del suelo, entre otros y anteriormente se encontraban en concentraciones que no perjudicaban las diferentes formas de vida(4–7).

Sin embargo, actualmente el contenido de metales pesados en el ambiente ha aumentado considerablemente debido a actividades antropogénicas como emisiones industriales, quema de combustibles fósiles, el uso no controlado de insumos agroquímicos, la explotación minera, el consumo de tabaco, por mencionar algunas(4,7–9).

Uno de los metales pesados más relevantes es el cadmio, ya que es el séptimo metal más tóxico según la clasificación de la Agencia Estadounidense para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades, y debido a su uso la población está constantemente expuesta al contaminante por dos principales vías oral o por inhalación(9–13).

En México se producen al año alrededor de 1.600 toneladas de cadmio (Cd), y se exportan abonos, químicos, fertilizantes, materiales fosfatados, antioxidantes y otros compuestos con ese componente nocivo. A pesar del daño que causa el cadmio a la salud humana y al ambiente, México no cuenta con ningún plan en marcha para reducir la presencia de este metal en productos industriales(14). La presencia de dicho metal ha sido estudiada ampliamente y se ha determinado que sus fuentes principales son antropogénicas, entre las que destacan: los fertilizantes fosfatados y nitrogenados, la minería, la industria de fundición de metales, la incineración, entre otros. Debido a lo anterior instituciones gubernamentales han establecido normas que regulan la presencia de cadmio en el ambiente y en los alimentos(1–5,13,15–18).

En México algunas de estas normas son: La NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales; la NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación y la NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica (15–17). Así mismo, la Agencia Estadounidense para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades cuenta con un perfil toxicológico del Cadmio donde se establecen los niveles de exposición que suponen un riesgo mínimo para el ser humano (10).

1.1. Cadmio como contaminante de mantos acuíferos

Desde finales del siglo XX en México se han detectado niveles altos de cadmio en suministros de agua (2,3,8,19), siendo una de las principales fuentes de contaminación para los organismos acuáticos, quienes pueden acumular el metal y promover con ello su ingreso a la cadena alimenticia (3,5,7,20).

Para evaluar la calidad del agua en ríos, embalses, manantiales y aguas costeras para sus diferentes usos, se establecieron límites máximos permisibles de cadmio contenidos en el agua (15,21), como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Límites máximos permisibles para Cadmio (mg L^{-1})			
Lugar	Uso	Promedio mensual	Promedio diario
Ríos, embalses naturales y artificiales	Uso en riego agrícola	0.2	0.4
	Uso público urbano	0.1	0.2
Ríos	Protección de vida acuática	0.1	0.2
Aguas costeras	Explotación pesquera, navegación y otros usos.	0.1	0.2
	Recreación	0.2	0.4
	Estuarios	0.1	0.2

Por otro lado, la FDA ha determinado que los niveles de cadmio en el agua embotellada no deben exceder 0.005 mg/L (20).

1.2. Cadmio como contaminante del suelo

El cadmio se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre en una concentración de 0.1 mg/kg . En las rocas sedimentarias las concentraciones son más elevadas, por lo que las condiciones ambientales como la erosión causan el transporte de grandes cantidades del metal a los océanos cuyo, encontrando concentraciones de alrededor de $0.1 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (4,22,23).

En México, una de las principales causas de contaminación del suelo por cadmio es debido al tabaquismo, la minería y el uso de agroquímicos (24–26), sin embargo, también existen otras causas como los desechos de la fabricación de cementos y los residuos sólidos y de aguas residuales municipales (24).

La exposición de cadmio por el riego tiene como límite máximo permisible un promedio mensual de 0.05 mg L^{-1} y un promedio diario de 0.1 mg L^{-1} (15)

1.3. Cadmio como contaminante del aire

En México, la principal fuente de exposición por inhalación es el consumo de tabaco, sin embargo, la contaminación atmosférica y el cadmio identificado en las PM₁₀ o partículas con un diámetro igual o menor a 10 micrómetros, también tienen un papel importante en la exposición de este metal a la población mexicana. Por otro lado, también se encuentran expuestas aquellas personas que viven cerca de industrias que liberan este contaminante o que trabajan en industrias donde se generan niveles altos de cadmio en el aire (7,20,27–30).

En las industrias se aplican diferentes niveles de seguridad y normas de exposición, sin embargo, en México no se encuentran regulados los niveles de cadmio permitidos en el aire; no obstante, se sabe que los niveles de cadmio en el aire oscilan entre 0.1 y 5 ng/m³ en áreas rurales, de entre 2 a 15 ng/m³ en áreas urbanas y de 15 a 150 ng/m³ en áreas industrializadas (18).

1.4. Cadmio como contaminante de alimentos

La presencia de cadmio en el agua y el suelo puede causar que dicho metal se acumule tanto en plantas como en animales que son fuente de alimento para los seres humanos y de esta manera llegan al organismo causando diversos padecimientos (29,31,32).

México cuenta con la NOM-117-SSA1-1994 en la que se establece el método para la determinación de cadmio en alimentos, sin embargo, no se establecen los límites máximos permitidos (17), como es el caso de la normatividad de países como India, China, España, entre otros, que establecen límites variables que van desde los 0.05 a los 2.0mg kg⁻¹ dependiendo el alimento del que se analice (32).

1.5. Cadmio como contaminante en el organismo humano

Debido a la exposición constante a este contaminante en diferentes regiones se ha estudiado la presencia de este en el organismo humano. En México no existe alguna norma que establezca los niveles máximos permitidos, sin embargo, en algunos estudios a nivel mundial se ha cuantificado la cantidad de cadmio en la sangre (20,29) y se sabe que el nivel geométrico de cadmio en la población general (≥ 1 año de edad) es de 0.315 µg/L (20,33). Por otra parte, en un estudio realizado por Torres y colaboradores en la Ciudad de México, se obtuvo que el nivel medio de cadmio en sangre en hombres de 40 años fue de 2.61 ± 0.82 µg/L (29).

2. Efectos nocivos del cadmio en la salud

La ingestión o inhalación son las principales fuentes de absorción de cadmio en el ser humano lo que puede tener efectos nocivos a la salud, no obstante, la contribución del contaminante por cada fuente varía según la población estudiada (18,27–32)

Algunos de los padecimientos que puede generar son: inflamación, osteoporosis, problemas respiratorios, patología renal, problemas en el sistema nervioso y también ha sido clasificado como carcinógeno principalmente en pulmón e hígado (27,34–36).

En México, la exposición humana al metal se ha evaluado en estudios de bajo tamaño de muestra y en poblaciones específicas, por ejemplo, en mujeres embarazadas y sus recién nacidos, niños de una edad específica y en tejido de las vías respiratorias (11,29,37,38).

2.1. Efectos en el tracto respiratorio

La absorción de cadmio tiene lugar principalmente a través del tracto respiratorio y se ha ligado con enfermedades respiratorias relacionadas con el tabaquismo, como la enfermedad pulmonar obstructiva

crónica y el cáncer de pulmón (38,39). Por otro lado, se sabe que el cadmio se convierte rápidamente en óxido de cadmio (CdO)(40) y se ha demostrado que la alta inhalación del mismo en forma de humo provoca inflamación pulmonar(40,41). En un estudio realizado por Rahman y colaboradores en Estados Unidos se encontró que este elemento está significativamente relacionado con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (42).

2.2. Efectos en los riñones

El cadmio se almacena principalmente en el hígado y los riñones; la excreción es lenta, con una vida media muy larga (décadas) en el cuerpo humano; además se acumula en la mayor parte de los tejidos durante el envejecimiento (18). El riñón es el órgano objetivo crítico, ya que es el primer órgano que muestra signos de toxicidad (43). Se ha calculado que del total del cadmio corporal 50% se acumula en el riñón y en algunos estudios realizados en México se ha relacionado la exposición a este metal con el daño renal y la enfermedad renal crónica (44–46).

2.3. Efectos en los en tejido óseo

El cadmio ocasiona una reducción de la densidad ósea y aumenta el riesgo de osteoporosis ya que disminuye las enzimas antioxidantes, favoreciendo un aumento del daño oxidativo, que incrementa el proceso de resorción ósea a través del TNF- α , así mismo se ha relacionado el cadmio con la osteoartritis y la artritis reumatoide (30,47).

2.4 Efectos en el sistema nervioso

Una gran cantidad de estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado la toxicidad del cadmio en el sistema nervioso central y periférico, este efecto neurotóxico se ha relacionado con el estrés oxidativo y la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que desempeñan un papel clave en el efecto neurotóxico de este metal. A nivel del sistema nervioso central (SNC), se ven afectados distintos compartimentos y células como lo son los pericitos, los astrocitos, las células microgliales, los oligodendrocitos y la barrera hematoencefálica, que protege el cerebro y la médula espinal de sustancias nocivas y tóxicas, por lo que está implicada en numerosos trastornos neurodegenerativos (48).

La exposición crónica y prolongada al metal afecta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, principalmente debido al debilitamiento de las defensas antioxidantes, lo que permite una entrada creciente del cadmio en el cerebro y una vez dentro puede generar daño cerebral y disfunción cognitiva, así mismo provoca un estrés oxidativo que influye en los pericitos, astrocitos y los oligodendrocitos que están relacionados con un funcionamiento cerebral adecuado (48,49).

El SNC es especialmente vulnerable al daño durante el desarrollo neonatal temprano puesto que el Cd puede pasar fácilmente al feto a través de la placenta, así mismo, se ha detectado este metal en la leche durante la lactancia (50). En niños se afecta el sistema nervioso central debido principalmente a que el desarrollo de la barrera hematoencefálica todavía no alcanza su madurez y es posible que el cadmio pase a través de ella con más facilidad, produciendo cambios neuropatológicos tales como: edema cerebral,

pícnosis, hemorragias, y necrosis en corteza parietal, cerebelo, putamen y núcleo caudado, pudiendo causar dificultad en el aprendizaje, hiperactividad y cambios conductuales (49,51).

Por otro lado, la exposición a cadmio produce una reducción de los niveles séricos de hormonas tiroideas (HT) en ratas adultas. En consecuencia, la reducción de los niveles de HT podría ser la causa de la alteración de la transmisión colinérgica e inducción de muerte de las neuronas colinérgicas, produciendo los efectos cognitivos observados tras la exposición a éste (52,53).

2.5. Cadmio como agente carcinógeno

La asociación entre el cadmio y el cáncer de pulmón está bien establecida en humanos y roedores. Se ha encontrado que la exposición de las células epiteliales pulmonares humanas al cadmio provoca la adquisición de características de las células cancerosas. Además, la transformación se produce a pesar de la capacidad de la célula para adaptarse a la exposición crónica al metal (35,54).

2.6. Otros efectos en la salud

El cadmio induce la alteración de la esteroidogénesis, trastornos del ciclo menstrual y de las hormonas reproductivas, retraso en la pubertad y la menarquia, pérdida del embarazo, parto prematuro y reducción del peso al nacer (39).

Por lo que es de suma importancia realizar la detección y cuantificación de cadmio, ya que este tiene un impacto importante en la salud pública y actualmente en México su presencia no se encuentra bien regulada, de modo que es necesario utilizar los diferentes métodos de cuantificación que existen para monitorear la presencia de dicho metal tanto en el ambiente como en el organismo.

3. Métodos de cuantificación para cadmio

El cadmio puede ser cuantificado mediante distintos métodos, entre los que destacan la espectroscopia de emisión atómica, la espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente, voltamperometría de redisolución anódica, fluorescencia de rayos X y la espectrofotometría de absorción atómica (29,55–57).

3.1. Espectroscopía de emisión atómica

En la espectroscopia de emisión atómica, los átomos del analito son excitados mediante calor o energía eléctrica que normalmente es proporcionada por un plasma, una flama, una descarga de baja presión o por un láser de alta energía. Este método se basa en la medición de la energía que emiten los átomos cuando pasan de un nivel permitido de alta energía a otro de menor energía, esto debido a la excitación por calor o energía eléctrica previamente mencionada (58–61).

Esta técnica permite realizar análisis simultáneos de los elementos metálicos y en algunos casos tiene alta sensibilidad, sin embargo requiere de un tamaño de muestra de hasta 2 gramos, lo que puede llegar a ser una desventaja cuando se trata de análisis en los que se tiene una cantidad reducida de muestra, por otro

lado, esta técnica es limitada para los halógenos y otros no metales, así mismo los costes iniciales son altos y no posee una alta sensibilidad como la Espectroscopía de Absorción Atómica por Horno de Grafito (60,62). Actualmente el plasma acoplado inductivamente (ICP) es la fuente más popular y usada en espectroscopía de emisión (59).

3.1.1 Espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

La espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) es utilizada para determinar trazas de elementos como el cadmio en una gran variedad de matrices, las cuales comúnmente deben digerirse previamente (57,63,64).

En la ICP-OES las muestras son introducidas en forma líquida, transformadas mediante un nebulizador en un aerosol y excitadas mediante un plasma de argón de alta temperatura. La radiación emitida a longitudes de onda características por los átomos de un elemento metálico se recoge mediante un sistema óptico y en ciertas condiciones es proporcional a la concentración (63,64).

Es una técnica ampliamente utilizada, sin embargo, cuenta con algunas desventajas ya que es una técnica de alto costo de adquisición y mantenimiento y requiere de capacitación especializada para su manejo(63).

3.2. Voltamperometría de redisolución anódica

La voltamperometría de redisolución anódica (ARV) es una potente técnica analítica para la detección de metales a niveles de trazas(56) en muestras ambientales acuosas, permitiendo analizar concentraciones del orden de las ppb (partes por billón) y hasta ppt (parte por trillón) (65)

También tiene la capacidad para la determinación cuantitativa simultánea de varios analitos y tiene un costo relativamente bajo de instrumentación (66). Adicionalmente, como las medidas electroquímicas son sensibles al estado de oxidación de los analitos, es posible realizar la especiación de los mismos (67).

En el análisis de muestras se realiza una etapa de preconcentración del analito a cuantificar que permite incrementar el límite de detección y aislar el analito de la matriz (66–68).

En dicha etapa una parte de los cationes metálicos se reducen y quedan depositados sobre el electrodo de trabajo, esto se consigue aplicando un potencial eléctrico negativo (66,67); posteriormente, partiendo de dicho potencial, se aplica un barrido de potencial creciente sobre el electrodo de trabajo, de forma que los distintos metales se oxidan al superarse su potencial de oxidación correspondiente, volviendo a la disolución de forma secuencial (66,67).

De esta manera, cada oxidación produce un pico de corriente eléctrica que permite obtener un voltamperograma donde la altura de cada pico es proporcional a la cantidad depositada de cada metal (67).

Dentro de las principales desventajas destacan las siguientes: sólo puede analizar metales que forman amalgamas con mercurio, así mismo el tiempo de análisis es más largo que con la espectroscopía y existen ciertos inconvenientes cuando se requieren altas sensibilidades ya que se requieren reactivos de calidad ultrapuro (calidad análisis de trazas), finalmente la aplicación de la ASV para la determinación de analitos en matrices de muestras complejas es complicada debido a la adsorción de componentes que interfieren

en la superficie del electrodo, con lo que se pierde la actividad del mismo y se obtienen resultados no reproducibles (69–71).

3.3. Fluorescencia de rayos x

La técnica de fluorescencia de rayos X (XRF) se utiliza para determinar concentraciones de elementos químicos en diversos tipos de muestras (72). Es una técnica analítica no destructiva utilizada para determinar la composición elemental de los materiales, se determina midiendo los rayos X fluorescentes (o secundarios) emitidos por una muestra cuando es excitada por una fuente con rayos X emitidos por un tubo de rayos X o una fuente radiactiva. Cada uno de los elementos presentes en una muestra produce un conjunto de rayos X fluorescentes característicos que es único para ese elemento específico, por lo que es una tecnología excelente para el análisis cualitativo y cuantitativo de la composición del material, por ser rápido, preciso y no destructivo, sin embargo, esta técnica no resulta adecuada para campos de aplicación que requieren métodos analíticos de alta sensibilidad (73,74).

4. Espectrofotometría de absorción atómica

La espectroscopia de absorción atómica (EAA), es una de las primeras técnicas de análisis elemental que se desarrolló comercialmente, se basa en la medición de la absorción específica de la radiación electromagnética por átomos en fase vapor no excitados (58,61,75)

La presente investigación se enfocará en la técnica por espectrofotometría de absorción atómica debido las ventajas que presenta sobre la mayoría de las técnicas previamente mencionadas, algunas de ellas son las siguientes: permite realizar análisis en un tiempo corto, tiene una alta sensibilidad, pocas interferencias, el manejo es sencillo y es de bajo coste. Además, el volumen de muestra utilizado es reducido y su preparación es sencilla, tiene alta precisión, es posible analizar ultratrazas y está mucho más automatizado que las otras técnicas (60,62,76,77).

4.1. Fundamento

Si se irradia con algún tipo de energía a un átomo que se encuentra en su estado fundamental, esta será absorbida por el mismo de tal manera que los electrones en su capa más externa se encontrarán en una configuración menos estable, llevando al átomo a un estado excitado. Cuando regresa a su estado fundamental, emite una cantidad de energía idéntica a su energía de excitación en ciertas longitudes de onda. Debido a que cada elemento tiene una estructura electrónica distinta, la longitud de onda de la luz absorbida y emitida es una propiedad única de cada elemento individual (60,61,77–81).

El proceso previamente mencionado está implicado en los campos de la espectroscopia atómica ya que la energía absorbida en el proceso de excitación o la energía emitida en el proceso de decaimiento se mide y se utiliza con fines analíticos. Así mismo, si se mide la cantidad de luz absorbida, se puede realizar una determinación cuantitativa de la cantidad de elemento analítico presente, adicionalmente el uso de fuentes de luz especiales y la selección de una longitud de onda específica permiten la determinación cuantitativa de elementos individuales en presencia de otros (60,61,75,77,79–81).

Por lo tanto, las técnicas de espectrofotometría de absorción atómica (AAS) se basan en el hecho de que un elemento absorberá la luz de una longitud de onda característica, elevándola de un estado fundamental a un estado excitado y la cantidad de energía absorbida será proporcional al número de átomos del analito en el paso de luz (60,61,75,77,79,82).

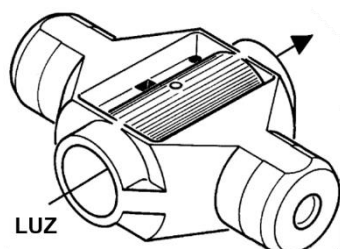
Para poder realizar las mediciones correspondientes se debe tener a los átomos libres (generar un vapor atómico), por lo que es necesario aplicar suficiente energía térmica a la muestra para disociar los compuestos químicos (77,79). Dicho proceso es denominado atomización y se realiza mediante un quemador que puede ser una flama o un horno de grafito, dando lugar a las principales variantes de la técnica denominadas: Espectrofotometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito (GF-AAS) y Espectrofotometría de Absorción Atómica por Flama (F-AAS) (79,82).

4.2. Instrumentación

Todo espectrofotómetro de absorción consta de los siguientes componentes: la fuente de luz o lámpara que emita luz del elemento a determinar, existen dos tipos fundamentales: lámparas de cátodo hueco (LCH) y lámparas de descarga sin electrodos (EDL) (60,61,77,78,80–83). Dicha fuente de luz debe ser modulada para proporcionar un medio de amplificar selectivamente la luz emitida por la lámpara de la fuente, dicha modulación puede lograrse con un *chopper* giratorio situado entre la fuente y el quemador, o pulsando la potencia de la fuente (77,78).

Así mismo, cuenta con un sistema para generar átomos libres en el haz de luz, esto se consigue generalmente introduciendo la muestra en el sistema de atomización o quemador que puede ser de flama o en un horno calentado eléctricamente (horno de grafito) y alineado en la trayectoria óptica del espectrofotómetro (60,61,77,78,80,81,83).

Esta investigación está enfocada en la técnica con horno de grafito debido a tres ventajas principales que tiene sobre la técnica con flama: la primera es la alta sensibilidad, la segunda es que el volumen de muestra a utilizar es reducido y la tercera es que tiene la capacidad de eliminar la matriz de la muestra antes de la atomización, lo que permite el análisis de muestras que están compuestas por matrices orgánicas complejas (61,77,78,80–82,84,85). El horno de grafito está formado por tres componentes principales: el atomizador, la fuente de alimentación y el programador. El atomizador se encuentra en el compartimento de muestreo del espectrofotómetro de absorción atómica, donde se produce la atomización de la muestra y la absorción de la luz. La fuente de alimentación controla la energía y los flujos de gas al atomizador bajo



la dirección del programador, que suele estar integrado en la fuente de alimentación o en el espectrofotómetro (77). Así mismo, este horno de grafito puede o no estar equipado con una plataforma L'vov.c hecha de una pieza plana de grafito pirolítico que se coloca en el fondo del tubo de grafito, dicha ayuda a eliminar algunas interferencias (77).

Ilustración 1. Horno de grafito. Modificado de: Richard D. Beaty y cols 1993 (77).

Finalmente, los equipos cuentan un monocromador para dispersar las distintas longitudes de onda de la luz emitida por la fuente y aislar la línea de interés, que es lo que permite la determinación de un elemento determinado en presencia de otros. La longitud de onda de la luz aislada por el monocromador se dirige al detector (60,61,78,81–83), que produce una corriente eléctrica que depende de la intensidad de la luz. La corriente eléctrica del fotomultiplicador es amplificada y procesada por la electrónica del instrumento para producir una señal que puede procesarse posteriormente para producir una lectura del instrumento directamente en unidades de concentración (77).

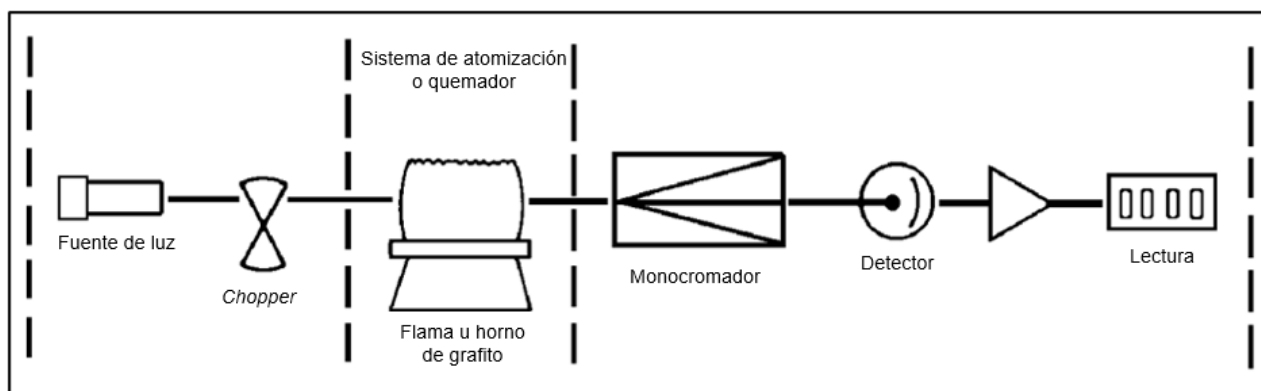


Ilustración 2. Componentes de un Espectrofotómetro de absorción atómica Modificado de: Richard D. Beaty y cols 1993 (77).

4.4. Espectrofotometría de absorción atómica de Flama

En la Espectrofotometría de Absorción Atómica por Flama (FAAS), una muestra líquida se convierte en vapor en un nebulizador y se aspira la muestra en la cámara del quemador, donde se mezcla con gases combustibles y oxidantes que son los componentes de la flama. A medida que las gotas de muestra pasan al calor de la flama se realiza la atomización. Estos átomos absorben cualitativamente la radiación emitida por la lámpara que llega al monocromador, donde se aísla la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura (75,77,80,81,86).

Las dos llamas de premezcla que se utilizan principalmente para la absorción atómica son el aire-acetileno y el óxido nitroso-acetileno (80,81). La flama de aire-acetileno es satisfactoria para la mayoría de los elementos determinados por absorción atómica mientras que la flama de óxido nitroso-acetileno es eficaz en el control de algunos tipos de interferencia (77).

5. Espectrofotometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito

En la espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito (GF-AAS), también denominada espectrofotometría de absorción atómica por atomización electrotérmica (ET-AAS), el sistema para generar

la atomización de la muestra es un tubo de grafito en el cual se inyecta el analito (normalmente 5-50 microlitros) a través de un orificio en el centro de la pared del tubo. El tubo se localiza entre dos contactos eléctricos que se mantienen dentro de un módulo refrigerado por agua y que proporcionan la conexión eléctrica, de tal manera que se lleve a cabo un programa de temperaturas: secado, incinerado o pilólisis, atomización y limpieza, hasta que el analito se haya atomizado y se registre la absorción (61,77,80–82,86). El grafito calentado está protegido de la oxidación del aire por las ventanas de cuarzo situadas en cada extremo del módulo y por dos corrientes de argón. Un flujo de gas externo evita la entrada de aire del exterior y permite que dentro del tubo se alcance la atomización de la muestra y una corriente interna, controlable por separado, que purga el interior del tubo eliminando los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento. El flujo de gas interno se debe reducir o interrumpir por completo durante la atomización, esto ayuda a maximizar el tiempo de permanencia de la muestra en el tubo y a aumentar la señal de medición lo que permite bajar los límites de detección al rango de partes por billón (ppb) (77,78,80,82,86). Debido a la alta sensibilidad de esta técnica, es extremadamente susceptible a la contaminación e interferencias, es por ello que puede requerirse un cuidado adicional en el manejo, el análisis y las condiciones analíticas de la muestra (78,82).

5.1. Interferencias

La técnica de absorción atómica con horno de grafito comenzó como una técnica propensa a las interferencias, sin embargo, esto no evitó que fuera utilizado durante mucho tiempo y se plantearon métodos que compensaran dichas interferencias. Posteriormente, con el avance de la tecnología y la comprensión de la técnica se logró entender las causas de las interferencias y de esta manera se desarrollaron nuevos instrumentos y procedimientos analíticos que las evitaran, por lo que hoy en día puede ser considerada como una técnica relativamente libre de interferencias. Las interferencias se pueden dividir en dos categorías generales: espectrales y no espectrales (77).

5.1.1. Interferencias espectrales

Las interferencias espectrales son aquellas en las que la absorción de luz medida es erróneamente alta debido a la absorción por una especie distinta del analito (77). La interferencia espectral más importante es la absorción de fondo. Esta es una atenuación no específica de la luz a la longitud de onda del analito, ocasionada por componentes presentes en la matriz de la muestra. Estas bandas de absorción se deben normalmente a absorción molecular o a dispersión de la luz causada por compuestos sin disociar de la matriz en el camino óptico durante la atomización (82).

La técnica de corrección de fondo de fuente continua ayuda a medir y compensar automáticamente cualquier componente de fondo que pueda estar presente en una medida de absorción atómica. Esta técnica tiene algunas limitaciones ya que requiere fuentes de luz continua adicional y electrónica, las intensidades de las fuentes primaria y continua deben ser similares, se requiere una alineación crítica del

continuo y las fuentes primarias para una corrección precisa y puede ser impreciso para la absorción de fondo estructurada (77,87,88).

Existe otra técnica, que es la corrección de fondo de Zeeman, esta mide la señal de la absorción de fondo a la longitud de onda exacta donde ocurre la señal de la absorción atómica. Corrigen absorciones de fondo mayores y más complicadas, y proveen resultados más precisos y exactos. Se usa para todos los elementos y todas las longitudes de onda. Las correcciones de fondo por Efecto Zeeman ofrecen ventajas significativas con respecto de las correcciones por fuentes continuas (82).

5.1.2. Interferencias no espectrales

Las interferencias no espectrales afectan la formación de átomos de analito, en esta se encuentran las interferencias por matriz, químicas y de ionización (77,87,89).

Las interferencias por matriz se dan en el proceso de nebulización, es el primer lugar en el proceso de atomización. Si la muestra es más viscosa o tiene características de tensión superficial considerablemente diferentes a las del estándar, la velocidad de absorción de la muestra o la eficiencia de nebulización pueden ser diferentes entre la muestra y el estándar. Si las muestras y los estándares no se introducen en el proceso a la misma velocidad, la cantidad de átomos en el haz de luz y, la absorbancia, no se correlacionarán entre los dos (77,87). La técnica de adición de estándar permite trabajar en presencia de una matriz de interferencia sin eliminar la interferencia en sí misma y aun así realizar una determinación precisa de la concentración del analito. Consiste en agregar alícuotas de un estándar a porciones de la muestra, lo que permite que cualquier interferencia presente en la muestra también afecte al estándar de manera similar (88,90).

Las interferencias químicas se dan en el proceso de atomización. En este paso, debe estar disponible suficiente energía para disociar la forma molecular del analito para crear átomos libres. Si la muestra contiene un componente que forma un compuesto térmicamente estable con el analito que no se descompone completamente por la energía disponible, existirá una interferencia química (88,90).

La interferencia por ionización ocurre cuando la temperatura del quemador tiene suficiente energía para provocar la eliminación de un electrón del átomo, creando un ion. A medida que estos reordenamientos electrónicos agotan el número de átomos en estado fundamental, se reduce la absorción atómica. Estas interferencias se pueden eliminar agregando a todas las soluciones estándar y a la muestra un exceso del elemento que sea fácilmente ionizable, por ejemplo: el sodio, potasio, litio o cesio, o mediante la disminución de temperatura (77,88).

5.2. Modificadores de matriz

Con la técnica GFAAS, es necesario el uso de un modificador de matriz para aumentar la estabilidad térmica del cadmio en la etapa de pirólisis, permitiendo un aumento de temperatura de varios cientos de grados sin pérdidas de este elemento. Como consecuencia, se puede obtener una mejora en la separación

del cadmio del resto de elementos de la matriz, reduciendo las interferencias de la volatilización de estos últimos (90).

Se han considerado varios tipos de modificadores de matriz, Petit y Rucandio utilizaron como modificador de matriz para la determinación de cadmio en muestras de cenizas volantes de carbón, suelo y sedimentos por GFASS, una mezcla del 2% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ más 0.4 % de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ en $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, empleando una temperatura de pirolisis de 900°C y una temperatura de atomización de 1800°C . Esta matriz proporcionó una mayor sensibilidad y un comportamiento eficiente en las muestras (83). Onk, PerkinElmer y Shelton utilizaron una mezcla de 0.1 % de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y 0.06 % de $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ pero en una solución de ácido nítrico al 10%, con un temperatura de secado de 110 y 130°C , 850°C de pirolisis, con una atomización a 1650°C y una limpieza a 2600°C (91). Los autores Correia y Oliveira utilizaron una solución compuesta de 0.05 % (p/v) $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y 0.03 % (p/v) de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, se utilizó una temperatura de secado de 110 y 200°C , la temperatura de pirolisis fue de 800°C , con una atomización de 1600°C y una limpieza de 2100°C (88,90,92).

Jeng y Yang, para la determinación de cadmio utilizaron $5 \mu\text{l}$ del modificador de matriz $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, utilizaron una temperatura de secado de 70°C , 110, 400 y 400°C durante la pirolisis, una etapa de atomización a 1800°C y una de limpieza a 2000°C (93). Por otra parte, Bruhn y Navarrete, sugieren que una solución de modificador de matriz al 2 % (v/v) en ácido nítrico y 0.126 M de nitrato de amonio, 0.026 M de fosfato monoamónico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y triton X-100 (0.02%) mejora significativamente la sensibilidad durante la cuantificación de cadmio, utilizando una rampa de temperatura de 110, 380, 800 y 2100°C para la etapa de secado, pirolisis, atomización y limpieza, respectivamente (94).

Los modificadores a base de fosfatos, generan estabilidad térmica, ya que se unen a los iones de cadmio formando pirofosfatos y otras especies químicas intermedias durante el pretratamiento térmico. Las desventajas del fosfato son su acción corrosiva sobre el grafito, su alta volatilidad y la excesiva absorción de fondo debido a la generación de especies absorbentes. Estos inconvenientes se pueden reducir usando modificadores mixtos, por ejemplo: $\text{PO}_4^{3-} + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, debido a que el nitrato de magnesio facilita la incineración de compuestos orgánicos y persiste en el atomizador de grafito, reduciendo el contacto de fosfato con la superficie del atomizador, lo cual disminuye su efecto corrosivo. Dentro de las sales de fosfatos empleadas el fosfato monoamónico tiene un efecto estabilizador mucho mayor que el ácido fosfórico (88,90,93).

Los modificadores mixtos son ventajosos en GFAAS porque a menudo exhiben efectos más versátiles, mayor eficiencia y una gama más amplia de analitos y matrices, tienen efectos sinérgicos pronunciados y moderan algunas propiedades negativas de los modificadores individuales (95).

5.3. Desarrollo del método

Como se mencionó previamente, el principio del método consiste en dispensar un volumen conocido de muestra en el horno, posteriormente la muestra se somete a un programa de temperaturas hasta el punto

en que se produce la atomización y se realiza la medición de la absorción atómica(77,78,81,82). Los parámetros del método bajo el control del operador son: el tipo de lámpara, ajustar el capilar del automuestreador (96), el volumen de muestra introducido en el horno y los parámetros de calentamiento para cada etapa, en los que se incluyen (77,78,80):

- Temperatura: temperatura durante cada fase del programa de temperaturas (secado, pirólisis, atomización y limpieza).
- Tiempo de rampa: tiempo requerido para el aumento de la temperatura.
- Tiempo de mantenimiento: tiempo que se mantendrá la temperatura.
- Gas interno: tipo de gas y flujo.

5.3.1 Volumen de muestra

Un volumen mayor de solución de muestra contiene más analito dando lugar a una mayor señal, sin embargo, este parámetro se puede ajustar de acuerdo con las características de la muestra. Si el analito se encuentra en concentraciones muy bajas o si se requiere mejorar los límites de detección, se puede utilizar el máximo volumen o se pueden realizar inyecciones múltiples con etapas de secado y pirólisis entre cada inyección para aumentar el tamaño efectivo de la muestra. Por otro lado, para concentraciones más altas o si la disponibilidad de muestra es limitada se pueden utilizar volúmenes de muestra más pequeños. De manera general, se plantea que un volumen de muestra conveniente para la mayoría de los análisis es de 20µL (77).

5.3.2 Periodo de Secado

El propósito del periodo de secado es remover el solvente y los componentes volátiles de la muestra (77,78,80–82,85) por lo que se debe establecer una temperatura que se encuentre por encima del punto de ebullición del disolvente, para las soluciones acuosas se utilizan temperaturas en torno a los 100 a 180°C (61,77,78,82) en una sola etapa, sin embargo, los componentes como los ácidos requieren incluso dos o tres secados para removerlos por completo(80). Un proceso de secado adecuado el solvente debe desaparecer gradualmente sin que se produzca una ebullición o salpicadura, ya que un secado incorrecto daría lugar a una mala precisión analítica y promueve degradación del tubo (77,80,97).

La "rampa" de temperatura proporciona un tiempo durante el cual se incrementa la temperatura. Los tiempos de rampa más largos proporcionan un aumento más lento y "suave" del calentamiento y se utilizan cuando la muestra debe ser atomizada desde la pared del tubo. Alcanzada la temperatura deseada, el horno se mantiene a la temperatura de secado seleccionada hasta que este proceso se complete, dicho tiempo de mantenimiento suele ser inferior a un minuto debido al volumen de muestra (77,80,97). Durante el proceso de secado, el flujo de gas interno se deja normalmente en su valor máximo por defecto (250-300 mL por minuto) para purgar el disolvente vaporizado del tubo (77).

5.3.3 Periodo de Pirólisis

El objetivo de la etapa de pirólisis, denominada también etapa de incineración o pretratamiento es eliminar los componentes inorgánicos y orgánicos de la muestra, dejando el analito en una matriz menos compleja para su análisis (61,77,78,80–82,85). Durante la pirólisis se aumenta la temperatura lo más alto posible para volatilizar los componentes de la matriz sin causar la pérdida del analito, por lo que la temperatura establecida dependerá tanto del analito como de la matriz (77,80–82). En lo concerniente al gas interno utilizado, puede ser ventajoso cambiar el gas interno, por ejemplo, a aire u oxígeno, durante la etapa de pirólisis para ayudar a la descomposición de la muestra, mientras que el flujo de gas interno se deja de nuevo a 250-300 mL por minuto (77).

5.3.4 Periodo de Atomización

El propósito de la atomización es producir un vapor atómico de los elementos del analito, permitiendo así medir la absorción atómica, por lo que es necesario elevar la temperatura de la muestra para disociar los compuestos químicos (61,77,78,80–82,85). Es de suma importancia establecer una temperatura de atomización adecuada ya que si es excesivamente alta el tiempo de residencia del analito en el tubo disminuirá y se producirá una pérdida de sensibilidad, así mismo, el uso de temperaturas de atomización excesivamente altas puede acortar la vida útil del tubo de grafito (77,80,97). Para esta etapa es recomendable aumentar la temperatura lo más rápidamente posible, por lo que los tiempos de rampa se ajustan a valores mínimos para proporcionar una mayor velocidad de calentamiento (77,78,80,97).

Finalmente es preferible reducir o interrumpir totalmente el flujo de gas interno durante la atomización ya que esto aumenta el tiempo de residencia del analito en el horno, maximizando la sensibilidad y reduciendo algunos efectos de interferencia (77,78,97). Al comienzo de esta etapa, se activa la función de "lectura" del espectrómetro para iniciar la medición de la absorción de la luz (61,77).

5.3.5 Periodo de Limpieza

Después de que se ha realizado la atomización se suele agregar una última etapa de limpieza para quemar cualquier residuo de muestra que pueda quedar en el horno y se realiza a temperaturas aún más altas (36,77,78,81,82,97). En algunos sistemas, se incluye automáticamente un paso de enfriamiento preestablecido en cada ciclo del horno, y no es necesario programarlo por separado (77).

5.3.6 Gas interno a utilizar

El argón suele utilizarse como gas de purga para eliminar los componentes de la matriz) y como gas protector (para proteger el tubo de grafito del aire ambiente. El uso de helio provoca una pérdida de sensibilidad debido a una mayor velocidad de difusión. El nitrógeno forma óxidos de nitrógeno tóxicos por encima de los 2000°C, y también provoca pérdidas de sensibilidad para algunos elementos. Por lo tanto, ambos gases no son una alternativa real (80).

5.3.7. Diseño/optimización de un programa de temperatura

El diseño de un programa de temperatura es muy importante dado que la eficiencia del tratamiento térmico de la muestra antes de la atomización puede favorecer o perjudicar la respuesta analítica del instrumento (98). Para realizar el diseño de las temperaturas se debe realizar una revisión bibliográfica previa con el objetivo de recabar información de las diferentes temperaturas que se plantean para la medición del metal de interés. Una vez que se tiene dicha información se establece un rango de temperaturas para cada etapa y se analiza un estándar para establecer la temperatura más adecuada (96,98–104). Es importante considerar que, si se va a utilizar un modificador de matriz, se debe realizar la optimización de las temperaturas utilizando el modificador debido al efecto que puede generar en la temperatura (90). A continuación, se muestra una tabla de diferentes programas de temperatura y flujo de gas planteados para la cuantificación de cadmio por GF-AAS.

Tabla 2. Programas de temperatura y flujo de gas para cuantificación de cadmio.					
Etapa	Temperaturas	Tiempo de mantenimiento (s)	Tiempo de rampa (s)	Flujo	Referencia
Secado	90			Argón 0.2 L/min	(104)
Pirólisis	120				
Atomización	650	-	-	Argón 0.2 L/min	
Limpieza	1500			Argón 0 L/min	
	2300			Argón 0.2 L/min	
Secado	90	50			(103)
Pirólisis	450	20			
Atomización	2200	2	-	-	
Limpieza	2240	2			
Secado	130	10	25	N ₂ 0.2 L/min	(102)
Pirólisis	280	5	10	N ₂ 0.2 L/min	
Atomización	1800	0	0.8	N ₂ 0 L/min	
Limpieza	2500	0	2	N ₂ 0.1 L/min	
Secado	50	15	3.3 (°C s ⁻¹)		(101)
	120	15	4.7 (°C s ⁻¹)	Argón 0.1 L/min	
	200	10	8 (°C s ⁻¹)		
Pirólisis	450	5	50 (°C s ⁻¹)	Argón 1.0 L/min	
			Potencia		
Atomización	1700	2	máxima aplicada	Argón 0 L/min	

Limpieza	2500	2	Potencia máxima aplicada	Argón 1.0 L/min	
Secado	110	10	5	Argón 0.25 L/min	(100)
	200	5	5		
Pirólisis	750	15	5	Argón 0.25 L/min	
				Argón 0 L/min	
Atomización	1600	5	0		
Limpieza	2100	3	1	Argón 0.25 L/min	
Secado	90	20	10 (°C s ⁻¹)	Argón 0.2 L/min	(99)
	130	15	30 (°C s ⁻¹)		
Pirólisis	400	20	150 (°C s ⁻¹)	Argón 0.2 L/min	
Atomización	1400	3	0 (°C s ⁻¹)	Argón 0 L/min	
Limpieza	2500	3	0 (°C s ⁻¹)	Argón 0.2 L/min	

Considerando la tabla anterior es posible realizar una propuesta de programa de temperaturas que deberá ser evaluada durante el desarrollo del método analítico.

Tabla 3. Propuesta de programa de temperatura y flujo de gas para cuantificación de cadmio.				
Etapas	Temperatura	Tiempo de mantenimiento	Tiempo de rampa	Flujo
Secado	90	30	15	Argón 0.2 L/min
Pirólisis	700	20	10	Argón 0.2 L/min
Atomización	2100	5	0	Argón 0 L/min
Limpieza	2400	2	1	Argón 0.2 L/min

Sin embargo, una vez desarrollado el método no es posible emplearlo inmediatamente para la determinación del metal en cuestión, primero este debe ser evaluado y sometido a estudios de laboratorio para asegurarse de que produce resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, debe de ser validado (78,105–108). Así mismo, de acuerdo con la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, los métodos deben estar documentados y los analistas deberán recibir una capacitación adecuada y demostrar su competencia en su utilización antes de emplearlo (105).

6. Validación del método

La validación es un procedimiento para establecer, mediante estudios de laboratorio, pruebas documentadas que demuestren científicamente que un método analítico cumple con las características de desempeño adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas previstas (106–110). Es decir, se realiza con la finalidad de demostrar empíricamente que es fiable y reproducible para producir los resultados esperados. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de

funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo (78).

6.1 Importancia de la validación

Actualmente se llevan a cabo una gran cantidad de pruebas y mediciones en laboratorios con diversos fines, entre los que destacan análisis para la asistencia médica, controlar la calidad de agua potable y alimentos, el análisis forense en las investigaciones criminales, entre otros, por lo que la mayor parte de los aspectos de la sociedad se apoyan en el trabajo analítico. El costo para llevar a cabo dichas pruebas es alto y pueden surgir costes adicionales considerando las decisiones tomadas a partir de los resultados (78,111).

La importancia de las pruebas y mediciones antes mencionadas radica en que algunos ensayos pueden derivar en indemnizaciones por reclamación cuando se trata, por ejemplo, de los alimentos que son no aptos para el consumo o aquellos ensayos que confirman la presencia de sustancias prohibidas que pueden generar sanciones económicas, así mismo, las pruebas realizadas con fines de salud pueden tener efectos negativos en la persona si se realiza un mal diagnóstico, por lo que es importante hacer un análisis correcto y ser capaz de demostrar que el resultado es fiables (78,111).

6.2 ¿Cuándo se debe realizar una validación?

Se indica en el apartado 5.4.5.2 de la Norma ISO/IEC 17025 que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla el usuario, los métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto (112).

6.3. Características de desempeño del método

De acuerdo con la ICH Q2(R1) de Validación de procedimientos analíticos, el procedimiento de validación va dirigido a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos (113):

- Pruebas de identificación: tienen por objeto garantizar la identidad de un analito en una muestra. Esto se consigue normalmente mediante la comparación de una propiedad de la muestra con la de un estándar de referencia.
- Pruebas cuantitativas y límite de contenido de impurezas: cualquiera de las dos pruebas pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra. Para una prueba cuantitativa se requieren diferentes características de validación que para una prueba de límite.
- Pruebas cuantitativas del principio activo en muestras de sustancia o producto farmacéutico o de otro(s) componente(s) seleccionado(s) en el producto farmacéutico: el ensayo representa una medición cuantitativa del componente o componentes principales de la sustancia farmacológica.

En el caso del producto farmacéutico, se aplican también características de validación similares cuando se ensaya el componente o componentes activos u otros seleccionados. Las mismas características de validación pueden aplicarse también a los ensayos asociados con otros procedimientos analíticos (por ejemplo, la disolución).

Esta clasificación es similar a la planteada en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, la Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados de España y la Guía Para La Validación De Métodos Analíticos Y Bioanalíticos de Brasil en las que se mencionan los siguientes (108,111,114):

- Métodos para identificar el analito.
- Métodos para cuantificar las impurezas.
- Métodos para determinar el límite de impurezas.
- Métodos para cuantificar el analito.
- Y en el caso de la guía brasileña plantea también las pruebas de rendimiento, como por ejemplo de disolución y liberación de principio activo.

El objetivo del procedimiento analítico debe entenderse claramente, ya que esto regirá las características de validación que deben evaluarse como se muestra en la siguiente tabla obtenida de la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México (108):

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA / VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LÍMITE	
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SÍ	SÍ	SÍ	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SÍ	SÍ	NO	NO
ESPECIFICIDAD ²	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SÍ	SÍ	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SÍ	SÍ	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SÍ	SÍ	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA ² DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SÍ	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SÍ	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

Cada Guía de Validación cuenta con una tabla similar donde se establecen las características de desempeño a evaluar dependiendo del tipo de método del que se trate. A continuación, se enumeran las características típicas de validación que deben tenerse en cuenta.

6.3.1. Exactitud

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. Este se evalúa mediante el porcentaje de recobro considerando los resultados del análisis de las muestras y mide el sesgo del método (58,108).

6.3.2. Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una sustancia de referencia. Generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad (58,105,108).

6.3.2.1. Repetibilidad

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. Se determina a partir de los resultados obtenidos de la exactitud (porcentaje de recobro) y la linealidad del método (porcentaje de recobro) y de la relación de la concentración adicionada contra la concentración recuperada (58,115).

6.3.2.2. Precisión intermedia

La reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia) expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días (mínimo dos) y con diferentes analistas (condiciones de precisión intermedia). Se evalúa por medio del coeficiente de variación de todos los resultados analíticos, el cual debe de cumplir con el criterio de aceptación establecido (58).

6.3.3. Especificidad (Selectividad)

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos de interés. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método (98),

Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalentes, algunos autores los diferencian, considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto (115).

Autoridades internacionales acreditadas (IUPAC, AOAC-I) han preferido el término “selectividad”, reservando “especificidad” para aquellos procedimientos que son completamente selectivos. La demostración de la especificidad, en el caso de ensayo, requiere que se pueda demostrar que el procedimiento no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto se puede

hacer agregando productos con niveles apropiados de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado del ensayo no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños (116).

6.3.4. Límite de detección

El límite de detección (LD) es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. Esta solo indica que la cantidad del analito es superior o inferior a la concentración establecida. Se expresa generalmente como la concentración indicada en el método analítico (ppm, ppb, mg/g). El LD es un parámetro sensible pudiendo ser afectado por cambios menores del sistema analítico como por ejemplo la temperatura, pureza de reactivos, o que el equipo no esté debidamente calibrado. Este límite se puede determinar por métodos instrumentales o no instrumentales (58,108,117).

En los métodos instrumentales, se puede emplear el procedimiento basando en “la señal-ruido” o el de linealidad. En el primero, se evalúa obteniendo las respuestas analíticas de muestras de concentraciones conocidas del analito y por el establecimiento de la respuesta analítica a una concentración cero del analito (blanco o matriz analítica sin analito) a la que comúnmente se la llama “señal-ruido”.

En la linealidad, es necesario generar una relación de concentración vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentraciones por triplicado, lo que permitirá determinar la linealidad, estimar la pendiente y una medida de error de la respuesta, como es la desviación estándar de la regresión o de la ordena al origen. En los métodos no instrumentales se puede determinar empleando el procedimiento de linealidad, mencionado en el método instrumental (58).

6.3.5. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC), es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. Se puede determinar por métodos instrumentales o no instrumentales (58,105).

En los métodos instrumentales se puede determinar empleando el procedimiento de la señal- ruido o la linealidad, mencionados en el punto anterior. Y para los métodos no instrumentales es necesario generar una relación concentración adicionada vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá investigar la linealidad, estimar la pendiente y una media del error de la respuesta analítica, como es la desviación estándar de la regresión o de la ordena al origen(58).

6.3.6. Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean directamente proporcionales a la concentración del analito (sin sesgo) que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. El intervalo está comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito (incluyendo dichas concentraciones) y para el que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad, cuando se aplica el método analítico (58,108).

6.3.7. Otros parámetros a evaluar

Así mismo, existen otros parámetros o características a evaluar como la estabilidad de la muestra que se evalúa exponiendo el analito a condiciones de degradación forzada, por otro lado, si el analito se encuentra en matrices complejas se suelen utilizar modificadores de matriz por lo que también se debe considerar su efecto dentro del proceso de validación. Finalmente, también debe considerarse la estabilidad de la solución de referencia y de las muestras a utilizar (118).

Cada guía de validación cuenta con criterios de aceptación y métodos distintos para realizar la evaluación de las características de desempeño, a continuación, se muestra una tabla dónde se comparan los métodos y criterios de las distintas guías de validación y en el apartado número 7 se planteó una propuesta de protocolo de validación dónde se aplica cada característica de desempeño:

Tabla 4. Métodos y criterios de aceptación para evaluar las características de desempeño de un método.			
		Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)	Guía de Validación de Métodos Analíticos Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.
Exactitud	¿Cómo se determina ?	Puede determinarse por la aplicación del método analítico, a placebos o muestras adicionadas preparados de manera independiente, al menos por sextuplicado, obtenidas de acuerdo con un procedimiento específico. Dichas muestras deben contener todos los componentes del producto y además se debe adicionar la concentración del analito que represente el 100%.	Se preparan 6 muestras adicionadas del analito hasta completar el 100% de este en la muestra (por ejemplo: 15, 30, 45, 60, 75, 100%) y con el método se determina el contenido del analito. El mismo analista analizará las muestras adicionadas usando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito y el porcentaje de recobro.
	¿Cómo se evalúa?	Se evalúa mediante el porcentaje de recobro (cociente porcentual de la concentración recuperada entre la concentración adicionada).	Se determina mediante el coeficiente de variación y el intervalo de confianza del porcentaje de recobro.
	Criterios de aceptación	Un método estadístico que demuestre que la magnitud del sesgo es cero, indica que el método es exacto.	El intervalo de confianza debe de incluir el 100% ó que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98-102% si el método es cromatográfico o volumétrico 97-103% si el método es químico o espectrofotométrico 95-105% si el método es microbiológico. El CV: no debe de ser mayor de 2% si es método es cromatográfico o volumétrico, no mayor del 3% si es químico o espectrofotométrico y no mayor del 5% si es microbiológico

Precisión	¿Cómo se determina ?	A partir de una sustancia de referencia, el analista debe preparar por lo menos seis soluciones que representen el 100 % de la cantidad o concentración del analito en la muestra, ya sea, por dilución o por pesadas independientes y medir la respuesta dentro de una misma corrida analítica.	
	¿Cómo se evalúa?	Calcular el coeficiente de variación de la respuesta analítica.	
	Criterios de aceptación	Este valor debe cumplir con un criterio previamente establecido en función de la naturaleza de la respuesta analítica.	El coeficiente de variación (CV) para métodos físico-químicos debe de ser $\leq 1.5\%$ y para métodos biológicos $\leq 3\%$.
Repetibilidad	¿Cómo se determina ?	La repetibilidad se determina a partir de los resultados obtenidos de la exactitud (porcentaje de recobro) y de la linealidad del método (porcentaje de recobro) y de la relación de la concentración adicionada contra la concentración recuperada.	La repetibilidad se evalúa en conjunto con la exactitud del método y mediante la misma metodología. Se evalúa de la misma manera y con los mismos criterios de aceptación.
	¿Cómo se evalúa?	La repetibilidad se evalúa a) En el caso de la exactitud: Con el coeficiente de variación del porcentaje de recobro del analito. b) En el caso de la linealidad: Con el coeficiente de variación del porcentaje de recobro del analito, y con el coeficiente de variación de la relación concentración recuperada contra concentración adicionada.	

	Criterios de aceptación	La magnitud de la repetibilidad debe satisfacer el criterio de aceptación establecido, en función de la aplicación analítica del método, de la naturaleza del sistema y de la complejidad del método, entre otras.	
Precisión intermedia	¿Cómo se determina?	Se determina por el análisis de por lo menos tres alícuotas, tomadas de una muestra homogénea, para ser analizada en diferentes días (mínimo dos) por diferentes analistas (mínimo dos).	Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% (para contenido/potencia/valoración) o una muestra cuyo contenido este incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método (para impurezas) en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito de todas las muestras.
	¿Cómo se evalúa?	Se evalúa el coeficiente de variación.	
	Criterios de aceptación	Debe cumplir con el criterio de aceptación establecido.	El coeficiente de variación (CV) para métodos cromatográficos y volumétricos debe de ser $\leq 2\%$, para métodos químicos o espectrofotométricos $\leq 3\%$ y para métodos biológicos $\leq 5\%$
Especificidad	¿Cómo se determina?	Se debe determinar, la respuesta a componentes como: aditivos, sustancias auxiliares, sustancias relacionadas estructuralmente al analito, etc.	Establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis.
	¿Cómo se evalúa?	Se evalúa determinando si la respuesta del método solo se debe al analito.	

	Criterios de aceptación	La respuesta del método solo se deberá al analito.	
Límite de detección	¿Cómo se determina?	En los métodos instrumentales, se puede emplear el procedimiento basando en “la señal-ruido” o el de linealidad. En el primero, se evalúa obteniendo las respuestas analíticas de muestras de concentraciones conocidas del analito y por el establecimiento de la respuesta analítica a una concentración cero del analito (blanco o matriz analítica sin analito) a la que comúnmente se la llama “señal-ruido”. En la linealidad, es necesario generar una relación de concentración vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentraciones por triplicado, lo que permitirá determinar la linealidad, estimar la pendiente (b) y una medida de error de la respuesta (S_e), como es la desviación estándar de la regresión ($S_{\frac{y}{(x)}}$) o de la ordenada al origen (S_a). Se emplea la formula $LD = \frac{3.3 (S_e)}{b}$ En los métodos no instrumentales se puede determinar empleando el procedimiento de linealidad, mencionado en el método instrumental.	Es posible determinar el límite de detección (LD) mediante diferentes metodologías: LD con base en señal de Ruido. LD con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos. LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen
	¿Cómo se evalúa?		Cada metodología plantea diferentes formas y criterios para evaluar el límite de detección.
	Criterios de aceptación		El criterio de aceptación de LD con base en señal Ruido, debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite. Y el criterio de aceptación de LD en base en curva de calibración y desviación estándar o desviación estándar de regresión o desviación estándar de la ordenada al origen, el coeficiente

			de determinación (r^2) ≥ 0.98 , intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$) no debe de incluir el cero y debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.
Límite de cuantificación	¿Cómo se determina?	El límite de cuantificación (LC), es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. Se puede determinar por métodos instrumentales o no instrumentales. En los métodos instrumentales se emplea el procedimiento de la señal- ruido o la linealidad, mencionados en el punto anterior. Pero se utiliza la siguiente ecuación: $LC = \frac{10(S_e)}{b}$	LC con base en señal de Ruido. LC con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos. LC con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión LC con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen
	¿Cómo se evalúa?	Y para los métodos no instrumentales es necesario generar una relación concentración adicionada vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá investigar la linealidad, estimar la pendiente y una media del error de la respuesta analítica, como es la desviación estándar de la regresión o de la ordenada al origen.	
	Criterios de aceptación		El criterio de aceptación para LC, es el mismo que el de LD.

Linealidad del sistema	¿Cómo se determina?	Se debe investigar la relación concentración-respuesta en un intervalo que incluya al menos 5 niveles, por triplicado, de la concentración del analito. El intervalo debe incluir las concentraciones esperadas del analito según la aplicación analítica del método.	El analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs respuesta analítica. Calcular b_1, b_0, r^2, $IC(\beta_1)$. b_1: pendiente b_0: ordenada al origen r^2: coeficiente de determinación $r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$ $IC(\beta_1)$: intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$ $S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$

			* $t_{0.975, n-2}$ = Referirse al anexo 19 de la guía para determinar el valor de la t de Student.
	¿Cómo se evalúa?	Estimar los parámetros del modelo basado en métodos estadísticos (mínimos cuadrados, máxima verosimilitud, etc.).	Se evalúa obteniendo el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza de la pendiente de la gráfica que relaciona la concentración vs respuesta analítica.
	Criterios de aceptación	Deben establecerse criterios de aceptación para definir la calidad de ajuste al modelo, que como mínimo consideren un efecto significativo del modelo, una magnitud mínima del coeficiente de determinación o una prueba estadística de falta de ajuste	El coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.98 , intervalo de confianza de la pendiente ($IC(\beta_1)$) no debe de incluir el cero.
Linealidad del método	¿Cómo se determina?	Se realiza por lo menos a tres niveles de concentración del analito por triplicado. Inicialmente es recomendable hacer una gráfica con los resultados obtenidos de la concentración adicionada contra la concentración recuperada del analito y por medio de su examen visual, determinar una posible relación lineal	Con el método se determina el contenido del analito y se preparan 3 muestras adicionadas del analito hasta completar el 100% de éste en la muestra. Seleccionar dos niveles superior e inferior de la cantidad del analito y preparar la muestra adicionada por triplicado a cada nivel manteniendo constante la cantidad de muestra en los tres niveles Las muestras adicionadas se analizan usando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

	¿Cómo se evalúa?	Calculando el coeficiente de determinación (r^2), desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$) Se evalúa con el $(IC(\beta_1))$ y $(IC(\beta_0))$. Se debe calcular b_1, b_0, r^2, $(IC(\beta_1))$, $(IC(\beta_0))$ y $CV_{y/x}$. Calcular el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada y calcular la media aritmética ($\bar{y}$), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza de la media ($IC(\mu)$) del porcentaje de recobro. $(IC(\beta_0))$: intervalo de confianza para la ordenada al origen. $IC(\beta_0) = \bar{b}_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$ $S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ $CV_{y/x}$: coeficiente de variación de regresión. $CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$ $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$
--	------------------	---

			(IC(μ)): intervalo de confianza de la media $IC(\mu) = y \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$
	Criterios de aceptación	Se debe de cumplir el criterio establecido en función con el coeficiente.	1. Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $r^2 > 0.98$ El IC(β_1) debe incluir la unidad El IC(β_0) debe incluir el cero El CVy/x del porcentaje de recobro: No mayor de 3% en método químico o espectrofotométrico No mayor a una magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra. 2. Porcentaje de recobro: El IC(μ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97-103% método químico o espectrofotométrico CV del porcentaje de recobro: No mayor de 3% en método químico o espectrofotométrico
Robustez	¿Cómo se determina?	Se deben establecer aquellos factores instrumentales (temperatura de la columna, presión en la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, volúmenes de solventes orgánicos)	Establecer los factores instrumentales (temperatura y presión de la columna) y/o no instrumentales (pH de fases) relacionados al método y sean críticos. En condiciones normales y distintas de operación, analizar la muestra por triplicado. Reportar el contenido del analito en la muestra de condiciones normal y distintas, expresadas como %.

	¿Cómo se evalúa?	Calcular la media aritmética de los tres niveles (inferior, normal y superior) y la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética de los niveles superior e inferior, comparada con el nivel normal; estos valores no deben exceder el criterio establecido.	Se evalúa calculando $\hat{y}_0, \hat{y}_1, d_i $. $\hat{y}_0$: media aritmética de la condición de operación $\hat{y}_1$: Media aritmética del análisis de cada condición de operación diferente a la condición normal $ d_i $: Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética de la condición normal.
	Criterios de aceptación	Se debe de cumplir el criterio establecido en función con el coeficiente.	$ d_i < 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos. No mayor a una magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra
Tolerancia	¿Cómo se determina?	Se deben establecer aquellos factores ajenos al método como: diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones. Fijar por lo menos dos condiciones y analizar una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Reportar los resultados de las muestras de las condiciones investigadas.	Establecer los factores ajenos al equipo (diferentes equipos, lotes de reactivos) que se presentan al reproducir el método en otras condiciones de uso. Fijar 2 condiciones de uso y analizar la muestra por triplicado a cada condición. Reportar el contenido del analito en todas las muestras
	¿Cómo se evalúa?	Calcular la media aritmética, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) de todos los resultados de todas las condiciones investigadas.	Calcular $\bar{y}$, S y CV del contenido/potencia/valoración.
	Criterios de aceptación	Se debe de cumplir el criterio establecido en función con el coeficiente.	$CV \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos

6.3.9. Revalidación de métodos

Si se realizan cambios importantes, se necesitará una validación completa. Si un método se modifica o se aplica en una situación nueva (por ejemplo, una muestra de matriz nueva) se necesitará una revalidación o una verificación, la revalidación puede ser necesaria en las siguientes circunstancias (105,107,110):

- cambios en la síntesis de la sustancia farmacéutica
- cambios en la composición del producto terminado
- cambios en el procedimiento analítico

El grado de revalidación necesario depende de la naturaleza de los cambios. Algunos otros cambios pueden requerir también una validación. La NOM-059-SSA1-2006 establece que una vez que se ha logrado el estado calificado/validado debe mantenerse a través de monitoreo de rutina, mantenimiento, procedimientos y programas de calibración, por lo que se debe efectuar una revisión periódica de las instalaciones, sistemas y equipos y cuando un cambio afecte la calidad o características del producto, o sus componentes y/o proceso, debe llevarse a cabo una nueva calificación y/o validación (119).

7. Propuesta de protocolo de validación

7.1 Resumen

El método para la cuantificación de cadmio no es un método compendial, por lo que se requiere optimizar el método y realizar la validación del mismo. La validación del sistema para el método de cuantificación de cobre considerará los parámetros de: linealidad (sistema), precisión (sistema, y precisión intermedia), exactitud, especificidad y robustez; considerando los requerimientos vigentes de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la Guía de Validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), la Conferencia internacional sobre armonización Q2-R1 (ICH: International Conference on Harmonisation), Reglamento Técnico de Centroamérica (RTCA) 11.03.39:06 y de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) Resolución –RE N° 899, de mayo 29, 2003.

La validación exitosa del método se demostrará mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos, por lo que los resultados deben ser reproducibles y confiables para la cuantificación de cadmio.

7.2. Objetivo

Demostrar que el método de cuantificación de cadmio (Cd) en muestras biológicas por espectrofotometría de absorción atómica es adecuado y confiable bajo condiciones específicas, a través de evidencia documentada generada de la evaluación de datos experimentales

7.3. Alcance

Para fines de este protocolo sólo considerará la validación del método para la cuantificación de Cd en muestras biológicas. Considerando como muestras biológicas: plasma.

7.4. Responsabilidades

- Es responsabilidad del Jefe del laboratorio proveer insumos, supervisar que el presente protocolo sea cumplido, así como revisar y autorizar el reporte de validación.
- Es responsabilidad de los asesores revisar y autorizar el presente protocolo, así como el reporte de validación.
- Es responsabilidad del analista ejecutar las pruebas de validación y realizar la evaluación de los resultados cumpliendo lo descrito en este protocolo. Deberá generar el reporte de validación.

Elaboró	Revisó	Autorizó
Elisa Deyaneira Valdez Mejía	Dr. Sergio Montes López	Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Analista	Investigador de Ciencias Médicas	Jefe de Laboratorio Neuroquímica
APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		

7.5 Índice

Definiciones	42
Materiales	42
Parámetros de validación	42
Linealidad del sistema (con estándar)	42
Especificidad	43
Selectividad	43
Efecto de la matriz biológica	43
Indicativo de estabilidad	44
Precisión del sistema	45
Precisión intermedia	45
Exactitud	46
Robustez	46
Estabilidad de la solución y muestra biológica	46
Control de cambios	47

Referencias

47

7.6. Definiciones.

- 7.6.1. Linealidad: capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra
- 7.6.2. Selectividad: capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra.
- 7.6.3. Matriz biológica: material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés
- 7.6.4. Precisión: grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad
- 7.6.5. Exactitud: concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia
- 7.6.6. |d|: Diferencia absoluta
- 7.6.7. NA: No aplica
- 7.6.8. r: Coeficiente de correlación
- 7.6.9. r²: Coeficiente de determinación
- 7.6.10. %RSD: Porcentaje de la desviación estándar relativa (por sus siglas en inglés)
- 7.6.11. Valor P: Medida de significación estadística
- 7.6.12. ppm: Partes por millón
- 7.6.13. ppb: Partes por billón

7.7. Materiales

- 7.7.1. Se empleará como sustancia de referencia (para adición de estándar) de cadmio una solución de calibración grado puro para espectroscopia de absorción atómica certificada (Perkin Elmer).
- 7.7.2. Todos los instrumentos y equipos serán documentados en el reporte de validación.

7.8. Parámetros de validación

7.8.1. Linealidad del sistema (con estándar)

7.8.1.1. Procedimiento

Solución Stock de de Cadmio 40µg/L o 40ppb: Transferir 40 µL de solución estándar de referencia de cadmio (10,000 ppm) a un matraz volumétrico de 10 mL que contenga 5 mL de HNO₃ 5%, mezclar y llevar a volumen con el mismo disolvente.

Solución de Trabajo de Cadmio 0.2ppm: se transferirán 50 µL de la solución Stock a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevará a volumen con ácido nítrico al 5%.

Solución de Curva de Cadmio: se realizarán 5 soluciones distintas para cada concentración de la curva, para las cuales se tomarán alícuotas de 25, 50, 100, 200, 300 µL de la solución de trabajo y se transferirán a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevará a volumen con ácido nítrico al 0.2%.

Modificador de matriz: transferir 0.1g de (NH₄)₂HPO₄, 0.25mL de Tritón x-100 y 0.1mL de HNO₃ en un tubo Falcon y mezclar adecuadamente.

Se evaluará por triplicado cinco niveles de concentración conocida: 0.5, 1, 2, 4 y 6 ppb. De las soluciones de curva se transferirán alícuotas de 200 µL de cada una y 800 µL del modificador como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Linealidad del sistema						
Réplicas	Nivel (%)	Alícuota de la solución de trabajo de Cadmio (µL)	Volumen total (mL)	Concentración de la solución de curva(ppb)	Alícuota de la solución de curva (µL)	Alícuota de Modificador de Matriz (µL)
3	12.5%	25	10	0.5	200	800
	25%	50		1		
	50%	100		2		
12	100%	200		4		
3	150%	300		6		

Puntos control						
3	80%	160	10	3.2	200	800
3	120%	240		4.8		

7.8.1.2. Condiciones de trabajo

Analizar a una longitud de onda de 228.8 nm y programar la siguiente rampa de temperatura en el equipo de absorción atómica.

Temperatura °C	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de mantenimiento (s)
90	15	30
700	10	20
2100	0	5
2400	1	2

7.8.1.3. Reportar el valor de la pendiente, intercepto, r , r^2 , el valor P y representar gráficamente la relación de la respuesta obtenida frente a la concentración real en ppb, para cada linealidad por separado. La concentración real es la corregida con la potencia del estándar

7.8.1.4. Criterios de aceptación

El coeficiente de correlación para la relación de la respuesta frente a la concentración en ppb debe ser $r \geq 0.99$; el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no debe incluir el cero; el intervalo de confianza del intercepto = Debe incluir el cero.

Resumen de resultados de prueba de linealidad del sistema ¹	
Coeficiente de correlación (r):	• Cumplió • No cumplió
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$):	• Cumplió • No cumplió
Intervalo de confianza del intercepto:	• Cumplió • No cumplió

¹Ver reporte de resultados para información más completa.

7.8.2. Especificidad

7.8.2.1. Selectividad

7.8.2.1.1. Procedimiento

Analizar de manera independiente una preparación del estándar de trabajo, del disolvente y el modificador de matriz verificando que la respuesta corresponda únicamente al analito.

Solución Stock de de Cadmio 40µg/L o 40ppb: Transferir 40 µL de solución estándar de referencia de cadmio (10,000 ppm) a un matraz volumétrico de 10 mL que contenga 5 mL de HNO₃ 5%, mezclar y llevar a volumen con el mismo disolvente.

Solución de Trabajo de Cadmio 0.2ppm: se transferirán 50 µL de la solución Stock a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevará a volumen con ácido nítrico al 5%.

Solución de Curva de Cadmio: se realizarán 5 soluciones distintas para cada concentración de la curva, para las cuales se tomarán alícuotas de 25, 50, 100, 200, 300 µL de la solución de trabajo y se transferirán a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevará a volumen con ácido nítrico al 0.2%.

Modificador de matriz: transferir 0.1g de (NH₄)₂HPO₄, 0.25mL de Tritón x-100 y 0.1mL de HNO₃ en un tubo Falcon y mezclar adecuadamente.

7.8.2.1.2. Analizar de acuerdo a lo establecido en el punto 7.8.1.2.

7.8.2.1.3. Criterios de aceptación

La respuesta del método solo se deberá a cadmio. El blanco no muestra señal al realizarse la corrección con el blanco de la curva de calibración.

7.8.2.2. Efecto de la matriz biológica

7.8.2.2.1. Procedimiento

Para realizar la validación del método empleado para la cuantificación de cadmio en muestras biológicas se debe emplear el método de adición de estándar.

7.8.2.2.2. **Plasma**

Digestión de la muestra: Centrifugar las muestras de sangre a 3000 rpm durante 5 minutos y transferir el plasma a un tubo de ensayo. Agregar 1 mL de HNO₃ concentrado y 640 µL, 800 µL o 960 µL de solución que contenga 10 ppm de cadmio a muestras independientes. Colocar en baño de agua a 60°C durante 30 minutos. Transferir a un matraz de 10 mL y aforar con agua desionizada.

Tomar una alícuota de 50 µL y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con HNO₃ al 2%, realizar por triplicado. La concentración adicionada de cobre para cada muestra es 3.2 ppb, 4 ppb y 4.8 ppb respectivamente.

7.8.2.2.3. **Blanco**

Se empleará como blanco plasma, al cual no se le haya adicionado solución estándar y se haya dado el mismo tratamiento que a las muestras. Realizar por triplicado.

Para estimar el % de recobro de las muestras deberá restar la cantidad de cobre obtenida en el blanco.

7.8.2.2.4. **Criterios de aceptación**

No interfiere en la cuantificación de cadmio

7.8.2.3. **Indicativo de estabilidad**

El estándar será expuesto a condiciones de degradación forzada: hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, degradación térmica y lumínica. Los resultados de las degradaciones forzadas serán comparados contra las soluciones de las mismas características que no hayan sido sometidas a condiciones de degradación forzada (solución control), para obtener la relación de degradación (estándar y muestra) o establecer el cambio de la señal (placebo). Preparar las siguientes soluciones como se indican a continuación:

Preparación de las soluciones control: Las soluciones del estándar se prepararán de acuerdo a lo descrito en la sección 7.8.2.1. Selectividad.

7.8.2.3.1. **Hidrólisis ácida:**

Estándar de cadmio:

Transferir 10 µL de solución stock de cadmio (100 ppm) a un matraz volumétrico de 10 mL que contenga 5 mL de HNO₃ 0.2%, y adicionar 1 mL de HCl 1N y sonicar durante 30 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, neutralizar adicionando 1 mL de NaOH 1N, mezclar y llevar a volumen con HNO₃ 2%. Transferir una alícuota de 50 µL de la solución anterior y diluir a 10 mL con HNO₃ 0.2%.

7.8.2.3.2. **Hidrólisis básica**

Estándar cadmio:

Transferir 10 µL de solución stock de cadmio (100 ppm) a un matraz volumétrico de 10 mL que contenga 5 mL de HNO₃ 0.2%, y adicionar 1 mL de NaOH 1N y sonicar durante 30 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, neutralizar adicionando 1 mL de HCl 1N, mezclar y llevar a volumen con HNO₃ 0.2%. Transferir una alícuota de 50 µL de la solución anterior, diluir a 10 mL con HNO₃ 0.2% y mezclar.

7.8.2.3.3. **Estrés oxidante**

Estándar de cadmio

Transferir 10 µL de solución stock de cadmio (100 ppm) a un matraz volumétrico de 10 mL que contenga 5 mL de HNO₃ 0.2%, y adicionar 1 mL de H₂O₂ 30% y sonicar durante 30 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con HNO₃ 0.2%. Transferir una alícuota de 50 µL de la solución anterior y diluir a 10 mL con HNO₃ 0.2%.

7.8.2.3.4. **Degradación lumínica**

Estándar de cadmio

Transferir una alícuota de 10 µL de la solución stock de cadmio. Dejar expuesto a la luz blanca durante 24 horas.

Analizar de acuerdo a lo establecido en el punto 7.8.1 Linealidad del sistema.

7.8.2.3.5. **Criterio de aceptación**

Indicativo de estabilidad: NA

Resumen de resultados de prueba de Especificidad ¹	
Especificidad	• Cumplió • No cumplió
Cambio de señal (blanco)	
Recobro en plasma (%)	
Recobro hidrólisis ácida (%)	
Recobro hidrólisis básica (%)	
Recobro estrés oxidante (%)	
Recobro degradación lumínica	

¹Ver reporte de resultados para información más completa.

7.8.3. **Precisión del sistema**

Determinar este parámetro utilizando las seis preparaciones correspondientes al nivel del 100% de la linealidad del sistema, realizar el cálculo del %RSD para cadmio.

7.8.4. **Precisión intermedia**

La precisión intermedia será realizada por dos analistas, quienes prepararán de manera independiente la curva de calibración y soluciones.

7.8.4.1. **Procedimiento**

Se realizará un análisis con 6 determinaciones por día, en dos días diferentes, siguiendo la preparación del estándar a una concentración nominal del 100% como se indica en el apartado 7.8.1. Linealidad del sistema de este protocolo. Programar el equipo para que cada lectura se realice por triplicado.

7.8.4.2. Calcular el promedio del contenido en (%), desviación estándar, el %RSD para cadmio por cada analista, el promedio general (%), el %RSD general y el coeficiente de variación (CV).

7.8.4.3. **Criterios de aceptación**

Precisión del sistema: %RSD debe ser ≤ 5.0 para % de contenido de cadmio.

Precisión intermedia: %RSD de cada analista y el %RSD general, no debe ser mayor a 5.0 % para el % de contenido de cadmio.

Coeficiente de variación (CV): Menor o igual al 2%

Resumen de resultados de prueba de Precisión ¹	
Precisión del sistema. %RSD:	• Cumplió • No cumplió
Precisión intermedia. Analista 1	
Promedio (%):	
%RSD:	
Promedio general:	
CV:	
Precisión intermedia. Analista 2	
Promedio (%):	
%RSD:	
Promedio general:	
CV:	

¹Ver reporte de resultados para información más completa.

7.8.5. Exactitud

Determinar este parámetro con los resultados obtenidos de la linealidad, calcular el porcentaje de recobro siguiendo para cada uno de los niveles con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Recobro} = \frac{\text{mg de cobre recuperados}}{\text{mg de cobre adicionados}} \times 100$$

7.8.5.1. Criterio de aceptación

El porcentaje individual deberá estar entre 95% a 105 % del rango de la cantidad adicionada

El porcentaje general deberá encontrarse entre el 97% a 103 % de la cantidad adicionada.

El %RSD no debe ser mayor a 5.0% para cadmio.

Resumen de resultados de prueba de Exactitud ¹	
Exactitud	• Cumplió • No cumplió
Recobro (%):	
Recobro general (%):	
%RSD:	
Coefficiente de variación de porcentaje de recobro (CV):	

¹Ver reporte de resultados para información más completa.

7.8.6. Robustez

7.8.6.1. Estabilidad de la solución y muestra biológica

En esta prueba se analizarán 2 muestras (plasma) y 2 estándares, con la siguiente variación en la preparación:

Solución Stock de de Cadmio 100µg/L o 100ppb: Transferir 100 µL de solución estándar de referencia de cadmio (10,000 ppm) a un matraz volumétrico de 10 mL que contenga 5 mL de HNO₃ 0.2%, mezclar y llevar a volumen con el mismo disolvente.

Solución de Trabajo de Cadmio: se realizarán 5 soluciones de trabajo, una por cada concentración, para las cuales se tomarán alícuotas de 25, 50, 100, 200 y 300µL, se transferirá a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevará a volumen con ácido nítrico al 0.2%.

7.8.6.2. Procedimiento

Al finalizar la preparación de las soluciones, los estándares y las muestras serán divididos en matraces de 10 mL. Posteriormente, almacenar a temperatura ambiente y refrigeración (4-5°C). Se analizarán al tiempo inicial (matraz 1) y a las 48 horas (matraz 2). Programar el equipo para que cada lectura se realice por triplicado.

7.8.6.3. Preparación de la muestra biológica

Ciclos de almacenamiento:

Una vez extraída la muestra de sangre almacenar a -70°C.

Realizar el análisis y la digestión como se indica en el punto 7.8.2.2.2. (adicionar 4 ppb de cadmio) 24 h y 48 después de su almacenamiento (1 muestra de sangre por día).

Comparar los resultados con los obtenidos en los obtenidos en el punto 7.8.2.2.2.

7.8.6.4. Criterio de aceptación: NA

Resumen de resultados de prueba de Robustez ¹	
Estabilidad de la solución	Temperatura ambiente d 24 horas: Temperatura refrigeración d 24 horas:

Tiempo de congelación	24 horas, % recobro: 48 horas, % recobro:
------------------------------	--

7.9. Control de cambios

Número de cambio	Realizó	Descripción del cambio
1ª Edición	Tu nombre	Emisión original

7.10. Referencias

- 7.10.1.** Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.
- 7.10.2.** Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria Resolución (ANVISA)
- 7.10.3.** International conference on harmonization validation of analytic procedures (ICH Q2-R)
- 7.10.4.** Turcios, J. (2010). Determinación cuantitativa de arsénico, cobre, plomo y cadmio en (brásica oleracea) brócoli que se cultiva en la parcela San José, Tecpán municipio de Chimaltenango. Disponible en: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/MAGEC40.pdf>
- 7.10.5.** Robledo, L. Castaño, A. (2012). Validación de la metodología para el análisis de los metales cadmio y plomo en agua tratada por absorción atómica con horno de grafito en el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la universidad tecnológica de Pereira. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3145/5430858R666.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Conclusiones

Debido a que el cadmio se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente y los efectos a la salud pueden llegar a ser muy graves, es de suma importancia desarrollar métodos adecuados para la cuantificación de cadmio con el objetivo de monitorear su presencia y evitar daños a la población. Para realizar el desarrollo de estos métodos es necesario elegir aquel que mejor se adapte a las necesidades del estudio a realizar y los recursos con los que se cuente y una vez elegido se debe conocer cada parámetro a controlar dentro del método para sacar el mejor provecho a cada técnica, posteriormente, ya que se ha desarrollado el método se debe realizar la validación correspondiente para asegurar que tanto el método como los resultados obtenidos son fiables.

Referencias

1. Delgado C, Bautista F, Gogichaishvili A, Cortés JL, Quintana P, Aguilar D, et al. Identificación de las zonas contaminadas con metales pesados en el polvo urbano de la Ciudad de México. Revista internacional de contaminación ambiental [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 31];35(1):81–100.

2. Castresana GP, Roldán EC, Suastegui WAG, Perales JLM, Montalvo AC, Silva AH. Evaluation of Health Risks Due to Heavy Metals in a Rural Population Exposed to Atoyac River Pollution in Puebla, Mexico. *Water* 2019, Vol 11, Page 277 [Internet]. 2019 Feb 5 [cited 2022 Mar 31];11(2):277.
3. Campos OG, Ortega ML, González RC. Bioacumulación de Cadmio (Cd) en Neritina reactiva de acuerdo a la NOM-029-SSA1-1996, en el Sistema Lagunar Tampamachoco, Veracruz, México. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan* [Internet]. 2013 Jul 21 [cited 2022 Mar 31];1(1):16–23.
4. Li F, Cai Y, Zhang J. Spatial Characteristics, Health Risk Assessment and Sustainable Management of Heavy Metals and Metalloids in Soils from Central China. *Sustainability* 2018, Vol 10, Page 91 [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2022 Mar 31];10(1):91.
5. Humberto Sepúlveda C, Ulloa Gómez MG, Góngora Gómez AM. Contenido de metales pesados (cobre, cromo, cadmio, níquel, plomo, arsénico, zinc y mercurio) en la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) de Bahía Altata, Sinaloa, y el riesgo potencial para la salud humana por su consumo [Internet]. [Ciudad de México]; 2018 [cited 2022 Mar 31].
6. Soria Mejía OI, Mastrocola Racines NA. Determinación de la presencia de metales pesados en tres vegetales Cadet, Tumbaco-Pichincha [Internet]. [Ecuador]; 2020 [cited 2022 Mar 31].
7. Núñez Nogueira G, Fernández Bringas LM. Efecto del lixiviado de manglar en la toxicidad de níquel y camio en el camarón estuarino (*Hippolyte zostericola*) de la Laguna de Términos, Campeche. *Kuxulkab'* [Internet]. 2018 Sep 13 [cited 2022 Mar 31];24(48):17–30.
8. Castro-González NP, Calderón-Sánchez F, Moreno-Rojas R, Tamariz-Flores JV, Reyes-Cervantes E. Heavy metals pollution level in wastewater and soils in the alto balsas sub-basin in tlaxcala and puebla, Mexico. *Revista internacional de contaminación ambiental* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 31];35(2):335–48.
9. Neira-Moscoso C, Rojas-Sánchez JM, Rodas-Espinoza C. Metales Pesados [Internet]. Vol. 66, Azuay. Ecuador : Universidad de Azuay; 2021 [cited 2022 Mar 31].
10. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for cadmium [Internet]. Atlanta, Georgia: Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU; 2012 [cited 2022 Mar 31]. p. 1–487.
11. Rodríguez-López E, Tamayo-Ortiz M, Ariza AC, Ortiz-Panozo E, Deierlein AL, Pantic I, et al. Early-Life Dietary Cadmium Exposure and Kidney Function in 9-Year-Old Children from the PROGRESS Cohort. *Toxics* [Internet]. 2020 Oct 7 [cited 2022 Mar 31];8(4):83.

12. Castillo-Nava D, Elias-Santos M, López-Chuken UJ, Valdés-González A, de la Riva-Solís LG, Vargas-Pérez MP, et al. Heavy metals (lead, cadmium and zinc) from street dust in Monterrey, Mexico: ecological risk index. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2020 17:6 [Internet]. 2020 Jan 28 [cited 2022 Mar 31];17(6):3231–40.
13. Benavides Fajardo SA, Soto Cabrera NM, Ugalde Cerón L, Hernández Islas S, Márquez Montesino F. Estimación del incremento de las emisiones de contaminantes a la atmosfera producto del proceso de cremación de cadáveres por covid-19 en la ciudad de México. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* [Internet]. 2021 Dec 2 [cited 2022 Mar 31];5(6):11676–700.
14. Inter Press Service. México esconde el cadmio debajo de la alfombra [Internet]. 2011 [cited 2022 Mar 31].
15. DOF - Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. [Internet]. 1997 [cited 2022 Mar 31].
16. DOF - Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación. [Internet]. 1 ciudad de México; 2014 [cited 2022 Mar 31].
17. DOF Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica. [Internet]. 1995 [cited 2022 Mar 31].
18. Pérez García PE, Azcona Cruz MI. Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgica* [Internet]. 2012 Jul [cited 2022 Mar 31];17(3):199–205.
19. Maya P, Hansen AM. Vista de Competencia de iones mayores en la migración química de cadmio y plomo en sedimentos del lago de Chapala, México. *Ingeniería Hidráulica en México* [Internet]. 1995 [cited 2022 Apr 7];X(1):35–42.
20. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. ToxGuide for Cadmium [Internet]. [cited 2022 Mar 31].
21. Mancilla Villa OR, Ortega Escobar HM, Ramírez Ayala C, Uscanga Mortera E, Ramos Bello R, Reyes Ortigoza AL. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental* [Internet]. 2012 Nov [cited 2022 Mar 31];28(1):39–48.

22. Rodríguez Garrido NE. Contaminación por metales pesados en suelos de la Comarca Lagunera [Internet]. [Torreón]; 2012 [cited 2022 Mar 31].
23. Reategui Barboza LJ, Reátegui Morales CP. Capacidad de absorción del *Helianthus annuus* en suelos agrícolas contaminados con cadmio [Internet]. [Callao]; 2018 [cited 2022 Mar 31].
24. Perez Perez Daniela Guadalupe. Determinación de la acumulación de cadmio en suelo del lecho seco del Río Nazas, por actividades industriales en Gómez Palacio, Durango [Internet]. [Torreón]; 2015 [cited 2022 Mar 31].
25. Martínez-Toledo Á, González-Mille DJ, García-Arreola ME, Cruz-Santiago O, Trejo-Acevedo A, Ilizaliturri-Hernández CA. Patterns in utilization of carbon sources in soil microbial communities contaminated with mine solid wastes from San Luis Potosi, Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021 Jan 15;208:111493.
26. Rivera-Hernández JR, Alvarado-Zambrano D, Gonzalez LA, Green-Ruiz CR. Subtotal content and geochemical fractionation of potential toxic elements in agricultural soils from Mocorito River basin in NW Mexico: environmental and health implications. <https://doi.org/10.1080/0960312320191700939> [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 31];31(8):915–31.
27. Fatima G, Raza AM, Hadi N, Nigam N, Mahdi AA. Cadmium in Human Diseases: It's More than Just a Mere Metal. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2019 34:4 [Internet]. 2019 Jun 27 [cited 2022 Mar 31];34(4):371–8.
28. Maddela NR, Kakarla D, García LC, Chakraborty S, Venkateswarlu K, Megharaj M. Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy: A critical view. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020 Jun 10 [cited 2022 Mar 31];720.
29. Torres-Sánchez L, Vázquez-Salas RA, Vite A, Galván-Portillo M, Cebrián ME, Macías-Jiménez AP, et al. Blood cadmium determinants among males over forty living in Mexico City. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Mar 31];637–638:686–94.
30. Fernández-Torres J, Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Nava GA, Aztatzi-Aguilar OG, Sierra-Vargas MP, Lozada-Pérez CA, et al. Impact of Cadmium Mediated by Tobacco Use in Musculoskeletal Diseases. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 31];
31. Wang P, Chen H, Kopittke PM, Zhao FJ. Cadmium contamination in agricultural soils of China and the impact on food safety. *Environ Pollut* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Mar 31];249:1038–48.
32. Suhani I, Sahab S, Srivastava V, Singh RP. Impact of cadmium pollution on food safety and human health. *Current Opinion in Toxicology*. 2021 Sep 1;27:1–7.

33. Gallego- Paz SY. Fuentes de exposición intradomiciliarias y su relación con los niveles sanguíneos de Plomo y Cadmio en un grupo de gestantes del oriente de Cali. [Internet]. 2013 [cited 2022 Mar 31]. p. 1–106.
34. Aguilera A, Bautista F, Gutiérrez-Ruiz M, Cenicerós-Gómez AE, Cejudo R, Goguitchaichvili A. Heavy metal pollution of street dust in the largest city of Mexico, sources and health risk assessment. *Environ Monit Assess* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Mar 31];193(4).
35. Kalubula M, Shen H, Khanam T. Assessment of carcinogenic and toxic substances in 'Insunko' herb. *Toxicology Reports*. 2020 Jan 1;7:468–74.
36. Sall ML, Diaw AKD, Gningue-Sall D, Efremova Aaron S, Aaron JJ. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Mar 31];27(24):29927–42
37. McRae N, Gennings C, Rivera Rivera N, Tamayo-Ortiz M, Pantic I, Amarasiriwardena C, et al. Association between prenatal metal exposure and adverse respiratory symptoms in childhood. *Environmental Research* [Internet]. 2021 Nov 27 [cited 2022 Mar 31];205:112448–112448.
38. Xiong R, Wu Q, Trbojevich R, Muskhelishvili L, Davis K, Bryant M, et al. Disease-related responses induced by cadmium in an in vitro human airway tissue model. *Toxicol Lett* [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2022 Mar 31];303:16–27.
39. Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Mar 31];17(11).
40. Hocaoglu-Ozyigit A, Nazli Genc B. Cadmium in plants, humans and the environment . *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*. 2020 Oct 16;1(1):12–21.
41. Dumkova J, Vrlíkova L, Vecera Z, Putnova B, Docekal B, Mikuska P, et al. Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Mar 31];17(6).
42. Rahman HH, Niemann D, Munson-McGee SH. Association between environmental toxic metals, arsenic and polycyclic aromatic hydrocarbons and chronic obstructive pulmonary disease in the US adult population. *Environmental Science and Pollution Research* 2022 [Internet]. 2022 Mar 18 [cited 2022 Mar 31];1–11.
43. Bernard A. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res* [Internet]. 2008 [cited 2022 Mar 31];128(4):557–64.

44. Mendoza Patiño N, Arturo De León Rodríguez J, Saavedra GF, Figueroa JL, Páez De La Luz H, Soval CS. Tóxicos renales. *Rev Fac Med UNAM*. 2006;49(1).
45. Torres Godoy EJ, Jarquín Iglesias M, Uriarte Barrera ED, Valerio Vásquez JA, Zamora Roque DA. Exposición a Cadmio e insuficiencia renal crónica en trabajadores del [Internet]. [Nicaragua]; 2000 [cited 2022 Mar 31].
46. Chávez-Gómez NL, Cabello-López A, Gopar-Nieto R, Aguilar-Madrid G, Marin-López KS, Aceves-Valdez M, et al. Enfermedad renal crónica en México y su relación con los metales pesados. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 31];55(6):725–34.
47. Trzcinka-Ochocka M, Jakubowski M, Szymczak W, Janasik B, Brodzka R. The effects of low environmental cadmium exposure on bone density. *Environ Res* [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Mar 31];110(3):286–93.
48. Branca JJV, Fiorillo C, Carrino D, Paternostro F, Taddei N, Gulisano M, et al. Cadmium-Induced Oxidative Stress: Focus on the Central Nervous System. *Antioxidants* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 May 6];9(6):1–21.
49. Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién (Mex)* [Internet]. 2011 [cited 2022 May 3];16(3):140–7.
50. Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 3];2013.
51. Sola Vendrell E. Efectos neurotóxicos del cadmio sobre el sistema colinérgico a nivel del sistema nervioso central de la rata y su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2021 [cited 2022 May 3].
52. Mohamed TM, Salama AF, Nimr TME, Gamal DME. Effects of phytate on thyroid gland of rats intoxicated with cadmium. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2015 [cited 2022 May 3];31(12):1258–68.
53. Sola E, Moyano P, Flores A, García J, García JM, Anadon MJ, et al. Cadmium-induced neurotoxic effects on rat basal forebrain cholinergic system through thyroid hormones disruption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2022 Feb 1;90:103791.
54. Person RJ, Tokar EJ, Xu Y, Orihuela R, Ngalame NNO, Waalkes MP. Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2022 Mar 31];273(2):281–8.

55. Martínez-Toledo Á, Montes-Rocha A, González-Mille DJ, Espinosa-Reyes G, Torres-Dosal A, Mejia-Saavedra JJ, et al. Evaluation of enzyme activities in long-term polluted soils with mine tailing deposits of San Luis Potosí, México. *Journal of Soils and Sediments*. 2017 Feb 1;17(2):364–75.
56. Ceyca-Contreras JP, Cortés-Gutiérrez EI, García-Salas JA, Dávila-Rodríguez MI, García-Hernández J. Evaluation of the genotoxic effect of heavy metals in pigeons from urban and rural habitat in Monterrey, Mexico, using the chromatin dispersion assay. *Biomarkers* [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 31];25(8):670–6.
57. Numa Pompilio CG, Francisco CS, Marco Tulio F de MT, Sergio Samuel SM, Fernanda Eliza GJ. Heavy metals in blood, milk and cow's urine reared in irrigated areas with wastewater. *Heliyon* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Mar 31];7(4).
58. Secretaría de Salud. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 11th ed. redalyc.org. Secretaría de salud; 2014.
59. Dagda Torres Abraham. Desarrollo de una síntesis de cristales porosos magnéticos para la extracción en fase sólida de arsénico. [Internet]. [Chihuahua]; 2017 [cited 2022 Apr 4].
60. Agilent Technologies. *Fundamentos de Espectroscopía Atómica: Hardware* [Internet]. Agilent. Academic & Institutional Research. Agilent; 2016 [cited 2022 Apr 3]. p. 1–46.
61. Skoog DA, West DM, Holler FJ, James C, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. 9na ed. Vega Orozco A, editor. Ciudad de México.: Cengage Learning Editores, S.A. de C.V.; 2005. 1–1090 p.
62. Gomis Yagües V. Tema 7. Espectroscopia de emisión y absorción atómica [Internet]. RUA. Alicante: RUA; 2008 [cited 2022 Apr 3]. p. 1–20.
63. Jiménez Heinert ME, Grijalva-Endara A de las M, Ponce Solórzano HX. Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). *RECIMUNDO* [Internet]. 2020 Oct 9 [cited 2022 Mar 31];4(4):4–12.
64. Instituto De Catálisis y Petroleoquímica. *ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA ICP-OES*.
65. Romero-Bonilla HÍ, Vera-Infante TG, Redrovan-Pesantez FF, Jumbo-Sari J del C, Franco Pesantez F. Aplicación de voltamperometría de redisolución anódica para la determinación de antimonio. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2019 [Internet]. 2019 Jul [cited 2022 Apr 1];85(3).

66. Tafur Salazar JL. Determinación de metales pesados Cd (II), Pb (II) y Hg (II) mediante voltametría de redisolución anódica en aguas residuales mineras (Distrito minero Portovelo-Zaruma) [Internet]. [Quito]; 2016 [cited 2022 Apr 1].
67. Universidad Pablo D Olavide. Determinación de Metales pesados en aguas por Voltamperometría de Redisolución [Internet]. Sevilla; 2004 [cited 2022 Apr 1]. p. 1–10.
68. Estrada Aldrete J. Electrodo de pasta de carbón modificados con residuos de café para cuantificar metales pesados en solución acuosa - Repositorio Institucional UANL [Internet]. UANL. 2014 [cited 2022 Apr 1]. p. 1–64.
69. Renteria B, Zepeda F, Vanegas Carvajal MA, Mendoza Blanco LJ. Estudio preliminar [i.e. preliminar] de un método voltamperométrico para la determinación de plomo en agua potable [Internet]. [León, Nicaragua]; 2008 [cited 2022 Apr 3].
70. Whitnack GC, Sasselli R. Application of anodic-stripping voltammetry to the determination of some trace elements in sea water. *Analytica Chimica Acta*. 1969;47(2):267–74.
71. Asghari A. Simultaneous determination of trace amounts of lead and zinc by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2008;12(2):410–8.
72. Valentinuzzi MC. Analisis por fluorescencia de rayos x: implementacion de guias de haces en reflexion total [Internet]. 2008 [cited 2022 Apr 3].
73. Thermofisher. What is XRF (X-ray fluorescence) and How Does it Work? [Internet]. Thermofisher Scientific. 2020 [cited 2022 Apr 3].
74. B. Beckhoff, B. Kanngießer, N. Langhoff R., Wedell H. Wolff. Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis. Vol. 50, X-Ray Spectrometry. Berlin: Springer; 2006. 1–898 p.
75. Agilent Technologies. Atomic Absorption Spectroscopy [Internet]. Agilent. [cited 2022 Apr 3].
76. Parra Morales WE, Vásconez Novoa MV. Validación del método de espectrofotometría de absorción atómica electrotermica para la determinación de cobre y vanadio en aguas limpias y residuales [Internet]. [Quito]; 2012 [cited 2022 Apr 3].
77. Richard D. Beaty, Jack D. Kerber. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry [Internet]. 2nd ed. Norwalk, CT, U.S.A: The Perkin-Elmer Corporation; 1993 [cited 2022 Apr 3]. 2–93 p.
78. Pazmiño Salazar EM, Cevallos Raza MG. Desarrollo e implementación de un método para la determinación de plomo por absorción atómica en horno de grafito en agua natural y

- potable en el L3C-EPMAPS [Internet]. [Quito]: Universidad Central del Ecuador; 2017 [cited 2022 Apr 3].
79. Engel Thomas, Reid Philip. Química Física [Internet]. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN S.A; 2006 [cited 2022 Apr 4]. 1–1090 p.
 80. Analytik Jena AG. Fundamentals , Instrumentation and Techniques of Atomic Absorption Spectrometry 2/ 65 [Internet]. Germany: Analytik Jena AG; [cited 2022 Apr 6]. 1–65 p.
 81. Fernández Maestre R, Colpas Castillo F. Espectroscopia de Absorción Atómica. Manual teórico-practico [Internet]. [Cartagena]; 1997 [cited 2022 Apr 4].
 82. Mañay N, Clavijo G, Díaz L. Capítulo 5. Absorción atómica con horno de grafito. In: M.I. Litter, M.A. Armienta, S.S. Farías, editors. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos [Internet]. 2nd ed. Argentina: CYTED; 2009 [cited 2022 Apr 3]. p. 79–92.
 83. Gallegos W, Vega M, Noriega P. Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. Revista de ciencias de la vida [Internet]. 2012 Mar 29 [cited 2022 Apr 4];15(1):18–25.
 84. Lewen NS, Schenkenberger MM. Atomic Spectroscopy, Pharmaceutical Applications. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. 2017 Jan 1;107–14.
 85. Akhyar Farrukh M. Atomic Absorption Spectroscopy [Internet]. 1st ed. Akhyar Farrukh M, editor. Croatia: InTech; 2011 [cited 2022 Apr 6]. 1–270 p.
 86. Ott I. Biodistribution of Metals and Metallodrugs. Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications. 2013;3:933–49.
 87. Castellanos Cuellar CI, Velandia Cabra RJ, González Curbelo MÁ, Varela Martínez DA, Ramírez Valencia E. Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro de absorción atómica AA-700 de Shimadzu. 1st ed. Bogotá: Universidad EAN; 2012. 1–79 p.
 88. Chan MS, Huang S da. Direct determination of cadmium and copper in seawater using a transversely heated graphite furnace atomic absorption spectrometer with Zeeman-effect background corrector. Talanta [Internet]. 2000 Feb 7 [cited 2022 Apr 3];51(2):373–80.
 89. Csuros M, Csuros C. Environmental sampling and analysis for metals. 1st ed. Environmental Sampling and Analysis for Metals. Boca Raton: CRC Press; 2019. 408 p.
 90. Rucandio I, Petit D. Determination of cadmium in coal fly ash, soil and sediment samples by GFAAS with evaluation of different matrix modifiers. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 1999;364(6):541–8.

91. PerkinElmer Inc, Ong K, Shelton C. Determination of Lead and Cadmium in Foods by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy. Perkin Elmer For Better. 2014;1–5.
92. Correia PRM, Oliveira E, Oliveira P v. Simultaneous determination of Cd and Pb in foodstuffs by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2000 Jan 24;405(1–2):205–11.
93. Jeng SL, Yang CP. Determination of lead, cadmium, mercury, and copper concentrations in duck eggs in Taiwan. *Poult Sci* [Internet]. 1995 [cited 2022 Apr 16];74(1):187–93.
94. Bruhn F. C, Navarrete A. G. Matrix modification for the direct determination of cadmium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 1981 Sep 1;130(1):209–14.
95. Agilent Technologies. The Role of Chemical Modifiers in GFAAS [Internet]. USA ; 2018 Apr.
96. Tobalina F. Soluciones Instrumentales, Trucos y Consejos en Técnicas de Absorción Atómica [Internet]. Agilent Technologies. Agilent Technologies; 2013 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–35.
97. Holcombe JA. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006 Sep 15.
98. Rodríguez Vega RA. Establecimiento de un método para determinar Arsénico en aguas residuales mediante Absorción Atómica Electrotérmica utilizando como modificadores de matriz $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2\text{-Mg}(\text{NO}_3)_2$. [Internet]. [Puebla]; 2014 [cited 2022 Apr 6].
99. Lopes AM de O, Chellini PR, de Sousa RA. Cadmium and Chromium Determination in Herbal Tinctures Employing Direct Analysis by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS). *Analytical Letters*. 2020 Sep 1;53(13):2096–110.
100. Correia PRM, Oliveira E, Oliveira P v. Simultaneous determination of Cd and Pb in foodstuffs by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2000 Jan 24;405(1–2):205–11.
101. Ribeiro Menezes IMN, Nascimento P de A, Gonzalez MH, Oliveira A. Simple and Robust GFAAS Methods for Determination of As, Cd, and Pb in Hemp Products Using Different Sample Preparation Strategies. *Food Analytical Methods* 2021 14:5 [Internet]. 2021 Jan 9 [cited 2022 Apr 6];14(5):1043–53.
102. Bakirdere S, Yaroğlu T, Tırık N, Demiröz M, Fidan AK, Maruldaı O, et al. Determination of As, Cd, and Pb in Tap Water and Bottled Water Samples by Using Optimized GFAAS System with Pd-Mg and Ni as Matrix Modifiers. *Journal of Spectroscopy* [Internet]. 2013 [cited 2022 Apr 6];2013:1–7.

103. Ivanenko NB, Solovyev ND, Ivanenko AA, Ganeev AA. Application of zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry with high-frequency modulation polarization for the direct determination of aluminum, beryllium, cadmium, chromium, mercury, manganese, nickel, lead, and thallium in human blood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012 Oct;63(3):299–308.
104. Volzhenin A v., Petrova NI, Skiba T v., Saprykin AI. Two-stage probe atomization GFAAS for direct determination of trace Cd and Pb in whole bovine blood. *Microchemical Journal*. 2018 Sep 1;141:210–4.
105. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. [Internet]. UNODC. Nueva York: UNODC; 2010 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–76.
106. Ministerio de Salud. GUIA DE VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS [Internet]. Vol. 1, Ministerio de Salud. Ministerio de Salud; [cited 2022 Apr 6]. p. 1–18.
107. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Internet]. EMEA. London: EMEA; 1995 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–15.
108. Colegio Nacional de Químico Farmacéuticos Biólogos México. Guía de validación de Métodos Analíticos. Ciudad de México; 2002.
109. Food and Drug Administration. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry [Internet]. FDA. FDA; 2005 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–22.
110. Organización Panamericana de la Salud. Validación de Métodos Analíticos [Internet]. PAHO. PAHO; 2008 [cited 2022 Apr 6]. p. 1–83.
111. Eurolab España, Morillas Bravo PP, R. Ellison SL, Engman J, Gjengedal ELF, Oxenbøll Lund U. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. [Internet]. Vol. 1, Eurachem. Eurachem; 2016 [cited 2022 Apr 16]. p. 1–66.
112. Internacional Organization for Standardization. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. [Internet]. ISO. ISO; 2005 [cited 2022 Apr 16]. p. 1–37.
113. International Conference on Harmonization. Validación de Métodos Analítico: Texto y metodología Q2 (R1). ICH. ICH; 2005. p. 1–17.
114. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa - RE 899. Anvisa [Internet]. 2003 May 29 [cited 2022 May 6];(899):1–12.

115. Castillo Aguilar B, González Hernandez R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia* . 1996 Apr;30(1).
116. USP. Validation of compendial procedures [Internet]. USP. 2017 [cited 2022 May 6]. p. 1–6.
117. ÁLVAREZ CASTILLO JN. Límites de detección y apreciación de cu, ni, zn, cd en aguas, suelos y sedimentos de la reserva biológica limoncocha para su validación analítica 2015-2017 [Internet]. [Quito]: Universidad Internacional SEK; 2017 [cited 2022 May 7].
118. DOF - Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. [Internet]. SEGOB. 2013 [cited 2022 May 6].
119. DOF - Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. [Internet]. SEGOB. 2016 [cited 2022 May 6].