



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Determinación de los niveles de plomo y cadmio en leche procesada en la ciudad de Bogotá D.C.

Carlos Giovanni Pinzón Choque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá D.C.; Colombia

2015

Determinación de los niveles de plomo y cadmio en leche procesada en la ciudad de Bogotá D.C.

Carlos Giovanni Pinzón Choque

Tesis de Grado como requisito parcial para obtener el título de:
Magister en Toxicología

Directora

MSc. Nancy Patiño Reyes

Toxicología Analítica y Toxicología de Alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá D.C.; Colombia

2015

Agradecimientos

A la Profesora Nancy Patiño Reyes docente del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por la dirección y constante asesoría en el desarrollo de esta tesis.

Al Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina, en dirección del Dr. Jairo Téllez y actualmente en dirección del Dr. Miguel Cote Menéndez y a cada uno de los docentes que hacen parte del Departamento.

Al Grupo de Investigación en Toxicología Ambiental y Ocupacional "Toxicao" en especial a la Línea de Investigación en Contaminación de alimentos por sustancias químicas y seguridad alimentaria.

A todas las personas que, de una u otra manera, hicieron posible este estudio.

Resumen

La leche y los productos lácteos han sido reconocidos en todo el mundo por su influencia beneficiosa sobre la salud humana. Los niveles de metales en concentraciones tóxicas son un componente importante de la seguridad y la calidad de la leche. Se desarrolló un método sencillo de extracción (digestión) asistida por microondas para la determinación posterior de los niveles de cadmio (Cd) y plomo (Pb) en leche líquida por espectrofotometría de absorción atómica (AAE) con horno de grafito. Se aplicaron las condiciones óptimas para el desarrollo de la validación del método; comprobando que el método desarrollado por el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina cumple con el fin provisto para la determinación de Cd y Pb por AAE y sus resultados son confiables. Los parámetros estudiados como linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), selectividad, precisión y exactitud permitieron emplear el método con éxito en las muestras estudiadas. Se determinaron los niveles de los metales Cd y Pb en leches comercializadas en la ciudad de Bogotá D.C., discriminando su productora o su marca, encontrando que los niveles de las muestras estudiadas cumplían con los parámetros normativos referidas en la Resolución 4506 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia con respecto al nivel máximo de Pb (0,020 mg/Kg), debido a que se encontraron dentro del rango de 6,08 a 17,09 $\mu\text{g/Kg}$ (0,006 a 0,017 mg/Kg). Los niveles encontrados de cadmio estuvieron en el rango de 13,86 a 19,90 $\mu\text{g/Kg}$ (0,014 a 0,019 mg/Kg). Los resultados de la leche procesada o comercializada indicaron que las condiciones ambientales y los procesos de fabricación juegan un papel clave en la distribución de metales tóxicos en la leche cruda y procesada. Las implicaciones toxicológicas de los niveles encontrados indican que el consumo de las leches comercializadas en la ciudad de Bogotá no representa un riesgo para la salud de sus habitantes.

Palabras clave: Leche, metales, cadmio, Cd, plomo, Pb, Espectrofotometría de Absorción Atómica

Abstract

Milk and dairy products have been recognized worldwide for its beneficial influence on human health. Toxic metals levels are an important component of the security and quality of milk. One simple method assisted extraction (digestion) was developed microwave for subsequent determination of the levels of cadmium (Cd) and lead (Pb) in fluid milk by atomic absorption spectrophotometry (AAE) with graphite furnace. Optimal conditions for the development of the method validation checking that the method developed by the Laboratory of Toxicology, Faculty of Medicine meets its intended use for the determination of Cd and Pb by AAE and its results are reliable were applied. The parameters studied as linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), selectivity, precision and accuracy allowed to use the method successfully in the samples studied. Levels of Cd and Pb metals in milk sold in the city of Bogotá were determined by discriminating its producer or brand, finding that the levels of the studied samples met the policy parameters referred to in Normativity 4506 of 2013 the Ministry of Health and Social Protection of Colombia by respect to Pb (0,020 mg/Kg), maximum because that were found within the range of 6,08 to 17,09 $\mu\text{g/Kg}$ (0,0060 to 0,017 mg/Kg). Cadmium levels found were in the range of 13,86 to 19,90 $\mu\text{g/Kg}$ (0,014 to 0,019 mg/Kg). The results of the processed milk or marketed indicated that environmental conditions and manufacturing processes play a key role in distributing toxic metals in raw and processed milk. The toxicological implications of levels found indicates that consumption of milk sold in the city of Bogota is not a risk to the health of its inhabitants.

Keywords: Milk, metals, cadmium, Cd, lead, Pb, Atomic Absorption Spectrophotometry

Contenido

	Pág
Resumen	iv
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	x
Lista de símbolos y Abreviaturas	xiii
Introducción	1
1. Marco Conceptual	5
1.1. Metales en los alimentos.....	5
1.2. Cadmio.....	7
1.2.1. Toxicocinética del Cd.....	9
1.2.2. Cd en el Ambiente.....	12
1.2.3. Toxicodinámica del Cd.....	13
1.3. Plomo.....	14
1.3.1. Toxicocinética del Pb.....	16
1.3.2. Pb en el ambiente.....	19
1.3.3. Toxicodinámica del Pb.....	20
1.4. Evaluación de la matriz - Leche.....	21
1.5. Análisis contexto nacional.....	24
1.6. Método Analítico.....	28
1.6.1. Método para Determinar Metales en Alimentos.....	28
1.6.2. Generalidades de Espectrofotometría de Absorción Atómica.....	31
1.6.3. Interferencias en Espectrofotometría de Absorción Atómica.....	36
2. Justificación	39
3. Objetivos	41
3.1. Objetivo general.....	41
3.2. Objetivos Específicos.....	41
4. Metodología	43
4.1. Toma de muestra: Plan de muestreo.....	43
4.2. Equipos, materiales y reactivos.....	46
4.3. Procedimiento para la determinación de Cadmio en leche.....	49
4.4. Procedimiento para la determinación de Plomo en leche.....	51
4.5. Condiciones óptimas para la determinación los análisis de interés.....	55
4.6. Validación del método analítico.....	55
4.7. Recopilación de datos.....	59

4.8.	Consideraciones éticas.....	59
5.	Resultados.....	61
5.1.	Validación del método analítico para determinación de Cadmio y plomo en leche comercializada líquida.....	61
5.1.1.	Linealidad del sistema para Cadmio.....	61
5.1.2.	Linealidad del método para Cadmio.....	63
5.1.3.	Límite de Detección (LD) y límite de Cuantificación (LC) para Cadmio.....	65
5.1.4.	Verificación de LD y LC para Cadmio.....	66
5.1.5.	Selectividad o especificidad para Cadmio.....	67
5.1.6.	Exactitud y Precisión para Cadmio.....	69
5.1.7.	Repetibilidad para Cadmio.....	72
5.1.8.	Linealidad del sistema para Plomo.....	72
5.1.9.	Linealidad del método para Plomo.....	74
5.1.10.	Límite de Detección (LD) y límite de Cuantificación (LC) para Plomo.....	76
5.1.11.	Verificación de LD y LC para Plomo.....	77
5.1.12.	Selectividad o especificidad para Plomo.....	78
5.1.13.	Exactitud y Precisión para Plomo.....	80
5.1.14.	Repetibilidad para Plomo.....	83
5.2.	Muestras de leches analizadas.....	84
5.3.	Determinación de los niveles de Cd y Pb en muestras de leche recolectadas en la ciudad de Bogotá D.C.....	85
5.4.	Implicaciones toxicológicas.....	87
6.	Análisis y discusión de resultados.....	89
7.	Conclusiones y recomendaciones.....	97
7.1.	Conclusiones.....	97
7.2.	Recomendaciones.....	98
Bibliografía.....		101
A.	Anexo: Acta de Aprobación de Comité de Ética.....	107
B.	Anexo: Imágenes de optimización y curvas (Screen software Solar equipo AA).....	109
C.	Anexo: Guía operativa del Espectrofotómetro de Absorción Atómica Thermo Elemental Solar iCE 3400.....	111
D.	Anexo: Peso de las muestras.....	117
E.	Anexo: Certificados de estándares de referencia Cd, Pb, Certificado de material volumétrico, Certificado de Calificación Operacional del Espectrofotómetro de Absorción Atómica iCE 3000 Series, Certificado de Calibración de la Balanza Analítica Digital Acculab.....	118

Lista de Figuras

<i>Figura No. 1. Toxicocinética del Cadmio. Adaptado de Ramírez A., 2002.....</i>	11
<i>Figura No. 2. Toxicocinética del plomo en humanos. Adaptado de Ramírez, 2005.....</i>	19
<i>Figura No. 3. Fuentes de contaminantes químicos en la leche.....</i>	23
<i>Figura No. 4. Comercialización de leche en la microcuenca de Valle de Ubaté y Chiquinquirá. Importancia de comercialización en el mercado de Bogotá. Adaptado de Valderrama P.A., 2003.....</i>	27
<i>Figura No. 5. Esquema de un fotómetro de llama y de un espectrofotómetro de absorción atómica. Tomado de Rocha Edmundo. Facultad de ciencias químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua.....</i>	33
<i>Figura No. 6. Procedimiento para la determinación de cadmio y plomo en muestras de leche por Absorción Atómica</i>	54
<i>Figura No. 7. Diagrama General para la determinación de cadmio y plomo en muestras de leche por Absorción Atómica</i>	54
<i>Figura No. 8. Gráfico de linealidad sistema Cd</i>	62
<i>Figura No. 9. Gráfico de residuales sistema Cd</i>	62
<i>Figura No. 10. Gráfico de linealidad método Cd</i>	63
<i>Figura No. 11. Gráfico de residuales método Cd</i>	64
<i>Figura No. 12. Gráfico de linealidad sistema Pb</i>	73
<i>Figura No. 13. Gráfico de residuales sistema Pb</i>	73
<i>Figura No. 14. Gráfico de linealidad método Pb</i>	74
<i>Figura No. 15. Gráfico de residuales método Pb</i>	75
<i>Figura No. 16. Distribución por clase de leche comercializada en Bogotá</i>	84

Lista de tablas

	Pág
<i>Tabla No. 1. Valores de concentración de Cd en diferentes ambientes. International Cadmium Association (2011). Available at http://www.cadmium.org</i>	13
<i>Tabla No. 2. Características toxicodinámicas del Cd en humano. Adaptado de Ramírez A., 2002</i>	13
<i>Tabla No. 3. Ingesta Semanal tolerable provisional de algunos metales y metaloides</i>	26
<i>Tabla No. 4. Participación en el mercado de Bogotá D.C. (Litros/día)</i>	27
<i>Tabla No. 5. Productoras y marcas de leche comercializadas en la ciudad de Bogotá D.C</i>	43
<i>Tabla No. 6. Estándares certificados y modificadores utilizados</i>	47
<i>Tabla No. 7. Programa para la digestión de muestras de leche en microondas - Cd</i>	49
<i>Tabla No. 8. Parámetros de operación del equipo para la determinación de Cd</i>	50
<i>Tabla No. 9. Programa del horno de grafito para la determinación de Cd</i>	50
<i>Tabla No. 10. Programa para la digestión de muestras de leche en microondas – Pb</i>	51
<i>Tabla No. 11. Parámetros de operación del equipo para la determinación de Pb</i>	52
<i>Tabla No. 12. Programa del horno de grafito para la determinación de Pb</i>	53
<i>Tabla No. 13. Parámetros y estadísticos para la validación</i>	58
<i>Tabla No. 14. Curvas Linealidad Sistema Cd</i>	61
<i>Tabla No. 15. Análisis de varianza del sistema para Cd</i>	62
<i>Tabla No. 16. Límites de confianza del sistema para Cd</i>	62
<i>Tabla No. 17. Estadísticos de regresión del sistema para Cadmio</i>	63
<i>Tabla No. 18. Curvas de Linealidad del Método Cd</i>	63
<i>Tabla No. 19. Análisis de varianza del método Cadmio</i>	64
<i>Tabla No. 20. Límites de confianza del método Cadmio</i>	64
<i>Tabla No. 21. Estadísticos de regresión del método Cadmio</i>	64
<i>Tabla No. 22. Límite de Detección (LD) y Limite de Cuantificación Cadmio</i>	65
<i>Tabla No. 23. Datos para la verificación de LD Cadmio</i>	66
<i>Tabla No. 24. Datos para la verificación de LC Cadmio</i>	66
<i>Tabla No. 25. Verificación del LD Cadmio</i>	66
<i>Tabla No. 26. Recuperación del LD Cadmio</i>	67
<i>Tabla No. 27. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LD Cadmio</i>	67
<i>Tabla No. 28. Verificación del LC Cadmio</i>	67
<i>Tabla No. 29. Recuperación del LC Cadmio</i>	67
<i>Tabla No. 30. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LC Cadmio</i>	67
<i>Tabla No. 31. Selectividad o especificidad para Cadmio</i>	68
<i>Tabla No. 32. Datos de especificidad y selectividad</i>	68

Tabla No. 33. Coeficientes de variación para el parámetro de selectividad Cadmio	68
Tabla No. 34. Recuperación en el parámetro de selectividad	68
Tabla No. 35. Parámetros de exactitud y precisión	69
Tabla No. 36. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 20,0 µg/Kg Cd	69
Tabla No. 37. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 40,0 µg/Kg Cd	69
Tabla No. 38. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 70,0 µg/Kg Cd	70
Tabla No. 39. Cuadrados medios concentración 20,0 µg/Kg	70
Tabla No. 40. F_{critico} , nivel 20,0 µg/Kg	70
Tabla No. 41. Porcentaje de Recuperación, nivel 20,0 µg/Kg	70
Tabla No. 42. Cuadrados medios, concentración de 40,0 µg/Kg	71
Tabla No. 43. F_{critico} , nivel 20,0 µg/Kg	71
Tabla No. 44. Porcentaje de Recuperación, nivel 40,0 µg/Kg	71
Tabla No. 45. Cuadrados medios concentración 20,0 µg/Kg	71
Tabla No. 46. F_{critico} , nivel 70,0 µg/Kg	71
Tabla No. 47. Porcentaje de Recuperación, nivel 70,0 µg/Kg	72
Tabla No. 48. Repetibilidad o Precisión Cadmio	72
Tabla No. 49. Coeficiente de variación para repetibilidad Cadmio	72
Tabla No. 50. Curvas Linealidad Sistema Pb	73
Tabla No. 51. Análisis de varianza del sistema para Pb	73
Tabla No. 52. Límites de confianza del sistema para Pb	74
Tabla No. 53. Estadísticos de regresión del sistema para Pb	74
Tabla No. 54. Curvas de Linealidad del Método Pb	74
Tabla No. 55. Análisis de varianza del método Pb	75
Tabla No. 56. Límites de confianza del método Pb	75
Tabla No. 57. Estadísticos de regresión del método Pb	75
Tabla No. 58. Límite de Detección (LD) y Limite de Cuantificación Pb	76
Tabla No. 59. Datos para la verificación de LD Pb	77
Tabla No. 60. Datos para la verificación de LC Pb	77
Tabla No. 61. Verificación del LD Pb	77
Tabla No. 62. Recuperación del LD Pb	78
Tabla No. 63. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LD Pb	78
Tabla No. 64. Verificación del LC Pb	78
Tabla No. 65. Recuperación del LC Pb	78
Tabla No. 66. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LC Pb	78
Tabla No. 67. Selectividad o especificidad para Pb	79
Tabla No. 68. Datos de especificidad y selectividad	79
Tabla No. 69. Coeficientes de variación para el parámetro de selectividad Pb	79
Tabla No. 70. Recuperación en el parámetro de selectividad	79
Tabla No. 71. Parámetros de exactitud y precisión	80
Tabla No. 72. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 20,0 µg/Kg Pb	80
Tabla No. 73. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 40,0 µg/Kg	80

Pb

<i>Tabla No. 74. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 125,0 µg/Kg Pb</i>	81
<i>Tabla No. 75. Cuadrados medios concentración 20,0 µg/Kg Pb</i>	81
<i>Tabla No. 76. F_{crítico}, nivel 20,0 µg/Kg Pb</i>	81
<i>Tabla No. 77. Porcentaje de Recuperación, nivel 20,0 µg/Kg Pb</i>	81
<i>Tabla No. 78. Cuadrados medios, concentración de 40,0 µg/Kg Pb</i>	82
<i>Tabla No. 79. F_{crítico}, nivel 40,0 µg/Kg Pb</i>	82
<i>Tabla No. 80. Porcentaje de Recuperación, nivel 40,0 µg/Kg Pb</i>	82
<i>Tabla No. 81. Cuadrados medios concentración 125,0 µg/Kg Pb</i>	82
<i>Tabla No. 82. F_{crítico}, nivel 125,0 µg/Kg</i>	82
<i>Tabla No. 83. Porcentaje de Recuperación, nivel 125,0 µg/Kg Pb</i>	83
<i>Tabla No. 84. Repetibilidad o Precisión Pb</i>	83
<i>Tabla No. 85. Coeficiente de variación para repetibilidad Pb</i>	83
<i>Tabla No. 86. Niveles de Cadmio y Plomo en muestras comerciales de leche líquida procesada</i>	85
<i>Tabla No. 87. Aproximación de los niveles aportados de metales por vaso de leche</i>	88

Lista de Símbolos, Abreviaturas y Siglas

Símbolo	Término	Unidad SI
Longitud	Centímetros	cm
Longitud	Milímetros	mm
Masa	Kilogramos	kg
Masa	Gramos	g
Masa	Miligramos	mg
Masa	Microgramos	μg
Volumen	Litro	L
Volumen	Mililitro	mL
Temperatura	Grados centígrados	$^{\circ}\text{C}$
Tiempo	Minutos	min
Tiempo	Segundos	s
Presión	Pascal	Pa

Subíndices

Término	Abreviatura
MS_b	<i>Cuadrados medios entre grupos</i>
MS_w	<i>Cuadrados medios dentro de los grupos</i>
SS_b	<i>Suma de Cuadrados entre grupos</i>
SS_w	<i>Suma de Cuadrados dentro de los grupos</i>
SS_t	<i>Suma de Cuadrados totales</i>
t_m	<i>Valor de t-student's calculado para la pendiente</i>
t_b	<i>Valor de t-student's calculado para la intercepto</i>
t_r	<i>Valor de t-student's calculado para coeficiente de correlación</i>
$F_{\text{calculado}}$	<i>Valor de la prueba de Fisher calculado</i>
F_{critico}	<i>Valor de la prueba de Fisher critico</i>

Superíndices

Término	Abreviatura
N	<i>Potencia, Exponente</i>
S^2	<i>Desviación Estándar al cuadrado</i>
R^2	<i>Coficiente de determinación</i>
v	<i>Variación</i>

Abreviaturas

Término	Abreviatura
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
Abs	Absorbancia
ATP	Adenosín trifosfato
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
ANOVA	ANalysis Of VAriance
As	Arsénico
Ar	Argón
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
AAS	Atomic Absorption Spectrometry
Na-K-ATPasa	Bomba de Sodio – Potasio
Cd	Cadmio
Co	Cobalto
Cu	Cobre
CV	Coefficiente de Variación
ENSIN	Encuesta Nacional de Situación Nutricional en Colombia
ENA	Encuesta Nacional Agropecuaria
AA (Español) o AAS (Ingles)	Espectrofotometría de Absorción Atómica
EEA	Espectrofotometría de Emisión Atómica
EFA	Espectrofotometría de Fluorescencia Atómica
TFG	Filtración glomerular
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
GFAAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
HACCP	Hazard analysis and critical control points
Fe	Hierro
HGAAS	Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission spectrometry
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry
ID	Identificación
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IEC	International Electrotechnical Commission
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilo Dalton
LC (Español) o LOQ (Ingles)	Límite de cuantificación
LD (Español) o LOD (Ingles)	Límite de detección

<i>LMR</i>	<i>Límite Máximo de Residuos</i>
<i>Mn</i>	<i>Manganeso</i>
<i>Hg</i>	<i>Mercurio</i>
<i>Mo</i>	<i>Molibdeno</i>
<i>Mi- ADMS</i>	<i>Monoisoamil meso 2,3 dimecartosuccionato</i>
<i>NAG</i>	<i>N-acetil-β-D –glucosaminidasa</i>
<i>NTC</i>	<i>Norma Técnica Colombiana</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<i>OCDE</i>	<i>Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos</i>
<i>ppb (μg/kg)</i>	<i>Partes por billón</i>
<i>ppm (mg/kg)</i>	<i>Partes por millón</i>
<i>Pb</i>	<i>Plomo</i>
<i>Se</i>	<i>Selenio</i>
<i>SS</i>	<i>Sum of Squares</i>
<i>CAC</i>	<i>The Codex Alimentarius Commission</i>
<i>UAT</i>	<i>Ultra Alta Temperatura</i>
<i>UHT</i>	<i>Ultra High Temperature</i>
<i>Una Norma Española</i>	<i>UNE</i>
<i>UV-Vis</i>	<i>Ultravioleta-Visible</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
<i>Zn</i>	<i>Zinc</i>
<i>ZZP</i>	<i>Protoporfirina zinc eritrocitaria</i>

Introducción

El tema de investigación que motivó el desarrollo de este trabajo se centra en el campo de la toxicología de alimentos; una de las áreas de interés dentro de la toxicología ambiental. El grupo de investigación en Toxicología Ambiental y Ocupacional “*Toxica*” del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina está avalado dentro de la Categoría C por Colciencias. Dentro del marco de especialización en el área de la toxicología de alimentos se desarrolla un tema que puede poner de manifiesto un potencial problema de salud pública a nivel local y que puede extrapolarse a nivel nacional ya que involucra un alimento de alto consumo nacional como lo es la leche; fuente primaria de muchos nutrientes en nuestra dieta alimentaria. En la ciudad de Bogotá D.C. se comercializan diferentes marcas y todo tipos de leche que son ampliamente consumidas por sus habitantes; su calidad e inocuidad por parte de los entes reguladores está siendo monitoreada y evaluada, sin embargo; en la actualidad la evaluación de metales pesados no está contemplada dentro del análisis. Por ello se propone cuantificar los niveles de algunos de los metales (Pb y Cd) por espectrofotometría de absorción atómica en la leche procesada líquida que se distribuye y comercializa en la ciudad de Bogotá D.C.

Diferentes fuentes antropogénicas y naturales pueden ser grandes contribuidores de metales en los alimentos. A nivel nacional y principalmente en los alrededores de las ciudades más importantes del país se ha visto un creciente proceso de industrialización que sin darnos cuenta y poco a poco pueden llegar a contribuir a nuestro medio ambiente un sin número de contaminantes. Estos contaminantes en diferente medida por la dinámica constante entran a la cadena trófica llegando directamente a los alimentos que consumimos a diario.

Este evidente progreso tecnológico sumado a las diversas actividades industriales y el aumento de tráfico en las carreteras han causado un incremento significativo en la contaminación del medio ambiente. La presencia casi ubicua de algunos contaminantes metálicos, especialmente Cd y Pb, facilita su entrada en la cadena alimentaria y por lo tanto aumenta la posibilidad de que se presenten efectos tóxicos en el ambiente, en los humanos y en los animales (*Licataa P, 2004*). Por otro lado, las actividades agrícolas, el uso de fertilizantes y el riego de los campos, también puede ser una fuente importante de contaminación del medio ambiente, de la cadena alimentaria y finalmente, de los alimentos consumidos por los humanos. La leche es un alimento básico en la dieta humana, tanto en su forma original como en diversos productos lácteos. Por lo tanto, la determinación de las concentraciones de metales residuales en la leche podría ser un indicador importante directo de la condición higiénica e inocua de la leche y/o de sus productos derivados, así como un indicador indirecto del grado de la contaminación del medio ambiente en el que se produce la leche. Se han realizado varios estudios de contaminación por metales en la leche a nivel internacional, sin embargo; los resultados varían en función de las distintas áreas de muestreo y los métodos analíticos empleados

para su determinación. En el contexto nacional no se han reportado intoxicaciones con leche contaminada con metales pesados; a su vez, tampoco se han publicado los niveles de metales presentes en este alimento o sus derivados; posiblemente porque no se le ha dado la debida importancia y/o no han salido a la luz estudios que demuestren el verdadero impacto que puede llegar a tener en la población (*Acosta N.M, 2011*).

El contenido de metales en alimentos es un aspecto importante tanto para los consumidores como para los productores principalmente por la inocuidad del alimento como tal pero también en cuanto el cumplimiento de los requisitos establecidos por la legislación nacional e internacional. La Comisión del CODEX Alimentarius (CAC) estableció límites para los elementos tóxicos como As, Cd, Hg y Pb sin embargo, no se ha informado el contenido máximo de otros elementos, como Cu, Fe, Mn, Zn, entre otros. Además, se establecen los niveles de elementos tóxicos especialmente en la leche sólo para Pb y Hg (*Acosta N.M, 2011*). En Colombia el Decreto 1880 de 2011 de la Presidencia de la Republica de Colombia por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional menciona en el Capítulo 3, numeral 3 que los niveles de sustancias tales como contaminantes químicos (metales pesados, residuos de medicamentos veterinarios, plaguicidas, entre otros) y toxinas, se deben regir por normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del Codex Alimentarius (FAO-OMS). A su vez el Decreto 616 de 2006 del Ministerio de Protección Social por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país; en el Artículo 32 señala que los niveles de sustancias tales como metales pesados, residuos de antibióticos o de otros medicamentos de uso veterinario, plaguicidas y aflatoxina M1, se deben regir por normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del Codex Alimentarius (FAO-OMS). Actualmente en Colombia la presencia de metales en la leche de acuerdo a la Resolución 4506 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social por el cual se establecen los niveles máximos de contaminantes en alimentos destinados al consumo humano, norma para el Pb un nivel máximo de contenido de 0,02 mg/kg y no establece niveles para Cd en este producto alimenticio.

En este sentido, la determinación de los metales en los alimentos es de gran importancia ya que la deficiencia o el exceso de metales podrían promover varios trastornos clínicos, como cáncer en las vías respiratorias, trastorno de la piel, anemia, depresión del crecimiento, deterioro en el rendimiento reproductivo, insuficiencia cardiaca, trastornos gastrointestinales, fatiga, disminución de la inmunidad e incluso la muerte dependiendo de la exposición, el tiempo y el metal o metaloide (*Pereira J.S.F., 2013*).

Algunos de los antecedentes que se tienen relacionados con la presencia de metales en leche se mencionan a continuación:

Se determinaron los niveles de elementos tóxicos así como elementos esenciales en leche bovina pasteurizada en la región de Vale do Paraiba en Brazil, en el año de 2004, los cuales fueron analizados por espectrofotometría de absorción atómica por llama y

electrotérmicamente, encontrando resultados significativos en los niveles de Pb en las muestras de leche con un valor promedio de 0,230 mg/L y hasta 0,476 mg/L sobrepasando los niveles establecidos en el país y los niveles establecidos por el Codex Alimentarius (Soares V.A., 2010).

En España se realizó un estudio que evaluó las concentraciones de elementos trazas esenciales tales como Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se y Zn y elementos tóxicos como As, Cd, Hg and Pb mediante la técnica ICP-MS con digestión ácida. Se encontraron concentraciones de metales tóxicos relativamente bajas (Rey-Crespo F., 2013).

En los últimos años muchos informes han reportado la presencia de metales pesados en leche y otros productos lácteos; (Maas S., 2011; González-Montaña J.R., 2009, Järup. L., 2003, Licataa P., 2004). Se midieron las concentraciones de elementos esenciales como el Zn y Cu y elementos potencialmente tóxicos como el Pb y Cd en diferentes muestras de leche y empaques de comida para bebés, evaluando los niveles recomendados tanto los elementos esenciales, como para los elementos tóxicos. Se encontró que la concentración de Cd es muy baja 0,1 mg/L y bastante constante en todos los tipos de leche. El contenido de Pb en la leche de vaca fue el más bajo incluso en comparación con la leche materna. Las concentraciones de los metales evaluados son aproximadamente un orden de magnitud mayor en los empaques para alimentación infantil que en diferentes tipos de leche evaluados (Tripathi R.M., 1999).

En otro estudio en Italia se evaluó la posible contaminación por metales pesados en leche de vacas que fueron criadas en diferentes granjas en la región de Calabria. Los análisis cuantitativos de Cd, Cr, Cu, Pb se realizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito; se concluyó que se necesitaban mayores estudios para determinar los niveles de As en esta zona tanto para evaluar este problema desde un punto de vista epidemiológico como para identificar la posible contaminación por este metaloide. Las concentraciones de Pb encontradas son inferiores al LMR establecido por el Codex (0,02 mg/kg) (Licataa P, 2004).

En Croacia se monitorearon los niveles de As, Cd, Cu, Hg y Pb en muestras de leche procesadas. Los niveles de Cu en ambas regiones fueron similares, sin embargo; fue preocupante los niveles de Pb encontrados ya que excedieron los niveles máximos recomendados (58,7 µg/L (norte) y 36,2 µg/L (sur)). Cabe mencionar que se encontraron también niveles de As así como de Hg en las leches provenientes de ambas regiones. El estudio recomienda un mayor control para confirmar la ausencia de posibles riesgos toxicológicos (Bilandžić N., 2011).

En el documento nacional de la Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos del Instituto Nacional de Salud (Acosta N.M, 2011); hace mención que dentro del contexto internacional existen diferentes estudios tales como: (Maas S., 2010) donde se evidenció que las muestras provenientes de dos granjas evaluadas superan los límites permitidos por el Codex Alimentarius para el caso del Pb (en el rango de 0,009 - 126 µg/g), y para el caso del Cd se encontraban las muestras en el rango de 0,34 -1,01 ng/g. El artículo publicado por Kazi y sus colaboradores muestran los valores

encontrados para metales tóxicos en leche cruda y procesada; concluyendo que no hubo diferencias significativas para los niveles de Cd entre las muestras de leche cruda y las muestras procesadas. No obstante, la concentración de Pb y Al fue mayor en la leche procesada que la obtenida en las granjas. Las muestras estuvieron por debajo de los límites establecidos por la legislación de Croacia: Pb <100 µg/L, Cd <10 µg/L. (*Kazi T.G., 2009*). Por otro lado en el artículo publicado por Enb A., *et. al.* se evidencia que algunas muestras superan el LMR del Codex Alimentarius para Pb (*Rodríguez H.R., 2005, Enb A., 2009*).

1. Marco conceptual

1.1. Metales en alimentos

La toxicología de los alimentos o toxicología bromatológica, es una especialidad de la toxicología ambiental; esta hace referencia al conocimiento de la naturaleza, origen y formación de sustancias presentes en los alimentos que producen efectos adversos a la salud humana (*Shibamoto T. 1993*). La evaluación de la seguridad alimentaria depende de la determinación de sustancias tóxicas en los alimentos; es de vital importancia desarrollar métodos analíticos precisos para interpretar los datos correctamente. Una de las tareas de análisis químico en la toxicología de alimentos implican la separación de una sustancia tóxica de otras sustancias químicas para poder determinar la cantidad del tóxico o contaminante de interés. Las sustancias tóxicas deben estar presentes en niveles muy bajos debido a que su presencia en cualquier nivel significativo hace del alimento no apto para el consumo humano. Al tener la capacidad de seleccionar con criterio la metodología adecuada para el aislamiento y detección de contaminantes en alimentos e interpretar el significado de la presencia de residuos tóxicos se pueden conocer las diferentes formas de prevención tendientes a minimizar los niveles de estas sustancias en los alimentos (*Shibamoto T. 1993*).

Existen diferentes fuentes principales de origen de los tóxicos: naturales, intencionales, accidentales y generadas por el proceso. Los tóxicos naturales son principalmente sustancias inocuas que en concentraciones mayores pueden llegar a ser tóxicas; los tóxicos intencionales son sustancias que son ajenas al alimento que han sido adicionadas con un fin establecido, los tóxicos accidentales son los que generan mayor riesgo para la salud, eventualmente pueden ser por contaminación cruzada y finalmente los tóxicos generados por el proceso son sustancias que se encuentran allí como resultado de la transformación de los alimentos, por estabilización, transporte, formulación entre otras (*Järup L., 2003*).

Las concentraciones de elementos trazas esenciales así como de elementos tóxicos en productos de origen animal están ligados en gran medida a la composición de la dieta animal, las prácticas agrarias y la exposición a elementos tóxicos en la ganadería (*Rey-Crespo F., 2013*). Como se mencionó en la introducción a nivel nacional la regulación de concentraciones máximas permisibles de los metales en la leche se encuentra normado en el Decreto 616 de 2006 y en el Decreto 1880 de 2011 los cuales hacen solo mención a que el contenido de metales debe regirse a normas internacionales como lo es el Codex Alimentarius cuando no exista dichos niveles estipulados a nivel nacional. De esta manera, la Resolución 4506 de 2013 del Ministerio de Protección Social establece los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano; tales como aflatoxinas, nitratos, melanimina, algunos radionucleótidos y en algunos

metales como Sn, Cd, Pb, Hg y As; así mismo establece el nivel máximo de contenido de Pb en leche de 0,02 mg/kg. Cabe mencionar que los niveles de Cd no están establecidos tanto por regulación nacional como internacional.

Las principales amenazas para la salud humana de metales pesados y metaloides están asociadas con la exposición al Pb, Cd, Hg y As. Estos metales y metaloides han sido ampliamente estudiados y sus efectos sobre la salud humana revisado periódicamente por organismos internacionales como la OMS (Organización Mundial de la Salud). Los metales pesados han sido utilizados por los humanos durante miles de años. Aunque son conocidos varios de los efectos adversos de metales pesados y metaloides en la salud, la exposición a estos continúa hasta la actualidad, e incluso está aumentando en algunas partes del mundo, en particular en los países menos desarrollados como lo es Colombia. Los compuestos de Cd actualmente se utilizan principalmente en las baterías de Ni-Cd recargables. Las emisiones de Cd se incrementaron dramáticamente durante el siglo XX, una de las razones es que los productos que contienen Cd rara vez se reciclan y a menudo se eliminan con la basura doméstica. El tabaquismo es la principal fuente de exposición al Cd en humanos; sin embargo, está visto que en las personas no fumadoras, los alimentos son la fuente más importante de exposición al Cd (*Järup L. 2003*).

La población general está expuesta al Pb del aire y de los alimentos en proporciones aproximadamente iguales. Durante el último siglo, las emisiones de Pb al aire han causado una considerable contaminación de alta importancia, debido principalmente a las emisiones de Pb procedentes de la gasolina. Los niños son particularmente susceptibles a la exposición al Pb debido a la alta absorción gastrointestinal y a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Aunque el Pb en la gasolina ha disminuido drásticamente en las últimas décadas, la eliminación gradual de los aditivos de Pb en los carburantes, el uso de pinturas a base de Pb, el Pb en los envases de alimentos y otras prácticas aún no han sido eliminadas por completo; lo que da lugar a una posible contaminación en los alimentos (*Järup L. 2003*).

La leche se conoce como una excelente fuente de Ca, y puede suministrar cantidades moderadas de Mg, de Zn y muy pequeños contenidos de Fe y Cu, pero debido a la contaminación del medio ambiente puede contener niveles de metales tóxicos (*Tripathi R.M., 1999, Kazi T. G, 2009, González-Montaña J.R.2009*). Los metales pesados entran en el cuerpo humano a través de la inhalación e ingestión. Es bien sabido que Pb y Cd son tóxicos y los niños son más sensibles a estos que los adultos. Los metales, a saber, Cu y Zn, son micronutrientes esenciales y tienen una variedad de funciones bioquímicas en todos los organismos vivos. Mientras Cu y Zn son esenciales, pueden ser tóxicos cuando se toman en exceso, la toxicidad y la necesidad varían de elemento a elemento.

La amplia distribución de metales pesados en el ambiente se debe principalmente a dos orígenes: las actividades humanas y los antecedentes geológicos. El Cd y el Pb son algunos de los metales pesados que han causado mayor preocupación en cuanto a los efectos adversos en la salud humana, esto debido a que se transfieren fácilmente a

través de las cadenas alimentarias y no se conoce ninguna función biológica esencial de ellos. Como resultado, la absorción regular de pequeñas cantidades de ciertos elementos, como el Pb, puede causar efectos graves en la salud de los niños en crecimiento, como retraso del desarrollo mental (problemas de aprendizaje), efectos adversos en la función de los riñones y del sistema cardiovascular, así como la degradación de la audición. El control de los niveles de estos elementos en los alimentos no sólo es un aspecto importante de la calidad de los alimentos, sino también de manera indirecta para monitorear los impactos de la actividad humana sobre el suelo, agua y aire (*Rahimi E., 2013*) específicamente en el campo de interés es un indicador indirecto de las condiciones ambientales locales o periféricas del suelo, agua, aire y vegetación de la zona donde se localiza el ganado.

1.2. Cadmio

El Cd es un elemento que se encuentra en forma natural en la corteza terrestre. Los óxidos, sulfuros y carbonatos son las formas más abundantes del Cd en la naturaleza. Los compuestos de Cd se encuentran a menudo adheridos a pequeñas partículas en el aire. Debido a que este metal no tiene un olor o sabor característico la mayoría de la gente no puede oler ni percibir el Cd en el aire, el agua o alimentos. Los suelos y las rocas contienen Cd en diversas cantidades, generalmente pequeñas, aunque a veces puede encontrarse en cantidades más grandes (por ejemplo, en algunos combustibles fósiles o fertilizantes). El Cd se produce de forma natural en minerales junto con el Zn, Pb y Cu.

El Cd tiene propiedades específicas que lo hace adecuado para una amplia variedad de aplicaciones industriales, como lo son la excelente resistencia a la corrosión, la baja temperatura de fusión, alta ductilidad, alta conductividad térmica y eléctrica. De acuerdo con el Servicio Geológico de Estados Unidos, los principales usos del Cd en 2007 fueron: baterías níquel cadmio (Ni-Cd) el 83%; pigmentos 8%; revestimientos y chapado 7%; estabilizadores para plásticos 1,2%; y otros (incluye aleaciones no ferrosas, semiconductores y dispositivos fotovoltaicos) 0,8% (*USGS, 2008, IARC MONOGRAPHS – 100C*).

El Cd también está presente como impureza en metales no ferrosos ya mencionados anteriormente (Zn, Pb y Cu), y el acero, los combustibles fósiles (carbón, petróleo, gas, turba, y madera), cemento y fertilizantes de fosfato. En estos productos, la presencia de Cd en general no afecta el rendimiento; más bien, se considera como una preocupación ambiental (*MONOGRAPHS – 100C*). En la unión europea el uso de Cd se ha disminuido considerablemente desde la década del noventa pero a pesar de estas reducciones en Europa, la producción de Cd, el consumo y las emisiones al medio ambiente en todo el mundo han aumentado dramáticamente durante el siglo XX. Las fuentes naturales y antropogénicas de Cd, incluidas las emisiones industriales y la aplicación de fertilizantes y aguas residuales en tierras de cultivo, pueden conducir a la contaminación de los suelos, y al aumento de la absorción de Cd por los cultivos y hortalizas, que se cultiva

para el consumo animal y humano. El proceso de absorción de Cd en el suelo por las plantas se ve aumentado a un pH 4. (Nordberg G.F. 2007).

Las fuentes naturales y antropogénicas tales como minas, desechos de fundición, fertilizantes comerciales derivado de los minerales de fosfato o los lodos de depuradora, vertederos de residuos municipales; contribuyen a los niveles de Cd que se encuentra en los suelos y sedimentos. La deposición de Cd atmosférico sobre las plantas y el suelo pueden conducir a que el Cd entré a la cadena alimentaria a través de la absorción foliar o captación radicular. La tasa de transferencia de Cd depende de una variedad de factores, incluyendo tasas de deposición, tipo de suelo y la planta, el pH de la tierra, el contenido de humus, la disponibilidad de la materia orgánica, el tratamiento del suelo con fertilizantes, la meteorología y la presencia de otros elementos, tales como Zn (OMS, 2000; UNEP, 2008, IARC MONOGRAPHS – 100C). Se han reportado concentraciones relativamente altas de Cd (> 1 mg/kg) en suelos cerca a fundiciones y otras zonas industrializadas (OMS, 2000).

El Cd entra al medio ambiente acuático de diferentes formas, tales como actividades agrícolas y escorrentía urbana. La meteorización y la erosión de rocas que contienen Cd dan a lugar a liberación este no sólo para la atmósfera, sino también para el suelo y el medio acuático, y directamente ya a través de la deposición de partículas en el aire (ATSDR, 2008; UNEP, 2008). También el Cd pasa al medio ambiente acuático a partir de una variedad de fuentes antropogénicas, incluyendo la minería de metales no ferrosos y fundición (de drenaje de agua de minas, aguas residuales, desbordamiento de estanque de relaves, el agua de lluvia en las zonas de minas), operaciones de chapado, fertilizantes de fosfato, plantas de aguas residuales, vertederos y sitios de residuos peligrosos (IARC, 1993a; ATSDR, 2008). En el año 2008 se estima que la meteorización y la erosión pudieron contribuir 15,000 toneladas de Cd al año para el medio ambiente acuático mundial, mientras que el polvo radioactivo de la atmósfera se estima puede contribuir entre 900 y 3600 toneladas (UNEP, 2008).

El tabaquismo es la principal fuente de exposición al Cd a las personas. Los alimentos son la fuente más importante de exposición al Cd en la población no fumadora. El Cd está presente en la mayoría de los productos alimenticios pero sus concentraciones varían de acuerdo al alimento, y su exposición varía de acuerdo a la ingesta del individuo y a las diferencias en los hábitos alimentarios (Shibamoto T., 1993; Nordberg G.F. 2007).

Se han reportado amplios rangos de concentraciones de Cd en los productos alimenticios procedentes de diversos países. Los datos de análisis realizados en varios países indican que la mayoría de los alimentos tienen concentraciones de Cd en el rango de 0,005 a 0,100 mg/kg (OMS/FAO, 2003). Ciertos alimentos (por ejemplo, las ostras) pueden contener concentraciones mucho más altas. Las concentraciones de Cd en el arroz integral en zonas no contaminadas japoneses son en promedio de 0,06 mg/kg (Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón, 2006). En algunas zonas contaminadas de Japón, se han reportado concentraciones Cd en el arroz de 0,1 a 4,2 mg/kg. En las zonas contaminadas en China, se han encontrado concentraciones medias

de aproximadamente 1,0 a 3,7 mg/kg del arroz. Se han reportado altos niveles de Cd en los vegetales en el año 2002 en un área cerca de Nanning, provincia de Guangxi, China, donde el cultivo del arroz se ha terminado debido a la contaminación por este metal (*Shibamoto T., 1993, Nordberg G.F. 2007*).

La IARC ha clasificado el Cd como un carcinógeno humano (grupo I). Hay pruebas suficientes en seres humanos para la carcinogenicidad del Cd y de compuestos de cadmio. El Cd y los compuestos de cadmio son causantes de cáncer del pulmón, adicionalmente se han observado asociaciones positivas entre la exposición al Cd y sus compuestos y el cáncer del riñón y de próstata (*IARC MONOGRAPHS – 100C*).

1.2.1. Toxicocinética del Cd (Figura No. 1)

Absorción

El tabaco es la fuente principal de la exposición a Cd en la población general. La inhalación es la vía principal de exposición al Cd; en caso de humos de Cd, se puede absorber hasta el 40-60% del Cd inhalado. De manera general, a través del sistema digestivo solo el 5% del Cd que es ingerido es absorbido; en niños puede ser significativamente más elevado. Una vez absorbido por la sangre, la mayoría del Cd es transportado vinculado a proteínas como la albumina y la metalotioneína. Tras la absorción es almacenado principalmente en hígado y riñón. El Cd tiene una vida media entre 15 y 30 años por lo que se puede detectar mucho tiempo después de la exposición (*ATSDR, 1999*).

Los datos sobre los efectos biológicos de Cd en las personas son incompletos en comparación con los datos del Hg y el Pb. Aparentemente sólo alrededor del 5% de Cd administrado por vía oral se absorbe en el tracto gastrointestinal. Las diversas sales de Cd difieren en su solubilidad en agua, y, por lo tanto, puede ser absorbida a diferentes grados. El Cd no se encuentra como derivados de alquilo estables que se esperaría que tendrían mayor solubilidad lipídica. El grado de absorción del Cd en el tracto gastrointestinal de ratas es considerablemente mayor en el animal recién nacido que en el animal más viejo. La absorción es dependiente de otros factores, por ejemplo; la absorción de Cd cuando se toma con leche es aproximadamente 20 veces mayor que la absorción de Cd que no se toma en leche. En los seres humanos la medida de la absorción de Cd puede ser mayor bajo la influencia de la deficiencia de calcio, proteínas, o Zn. En ratas el Cd absorbido se distribuye en el hígado, el bazo, las glándulas suprarrenales, y el duodeno dentro de 48 horas después de la administración. La acumulación es más lenta en los riñones (*Shibamoto T., 1993, Nordberg G.F. 2007*).

Por inhalación: La exposición al Cd por inhalación se produce en forma de aerosol. 10-50% de las partículas inhaladas se depositan en la parte alveolar del pulmón y la mayor parte en el resto de la mucosa traqueobronquial, estas partículas son transportadas a la faringe y depositadas en el tracto gastrointestinal. Para aerosoles de partículas finas

(sub-micras), como es el caso con la exposición a través de fumar cigarrillos, se estima que la absorción esta entre 25 y 50% (Nordberg G.F. 2007).

Por Ingestión: La absorción en animales esta entre el 1 y el 6% de la dosis administrada, mientras que en humanos es superior al 10%. La importancia de la composición de la dieta en general, muestra una disminución de la absorción cuando se aumenta el contenido de fibra y contrariamente cuando se tiene una baja ingesta de Fe, Zn, Ca, o proteína. El Cd unido a la metalotioneína puede ser absorbido por el tracto gastrointestinal en forma intacta y entrar en la circulación (alrededor de una absorción de 5% en hombres y 10% en mujeres) (Nordberg G.F. 2007).

Distribución y Metabolismo

Después de la absorción en los pulmones o el intestino, el Cd se transporta a través de la sangre a otras partes del cuerpo. El Cd en la sangre se encuentra principalmente en los eritrocitos, donde se une a una fracción de alto y de bajo peso molecular. La fracción de bajo peso molecular es similar a la metalotioneína, una proteína que también se une Cd en el plasma. El Cd también se une en menor proporción a compuestos ricos en grupos tioles SH como el glutatión y la cisteína (Nordberg G.F. 2007).

En sangre se encuentra aproximadamente 0,06% de Cd y más del 50% está en los hematíes unido inestablemente a una pseudoproteína (la metalotioneína). La metalotioneína es el “medio de transporte” del Cd en el plasma sanguíneo. El aclaramiento sanguíneo del Cd es rápido, se acumula principalmente en el riñón y en adultos no expuestos llega a valores entre 7,4 y 8,8 mg, lo que representa entre 30% y 50% de su contenido corporal. La concentración en la corteza renal es 1,5 veces mayor que la del riñón total y se fija en las células del túbulo proximal. El hígado de adultos no expuestos tiene en promedio 2,7 mg de Cd. El Cd unido a la albúmina es en gran medida absorbido por el hígado causando toxicidad en las células hepáticas (Oleru UG. 1976; Kido T., 1991).

En los experimentos de exposición crónica, se han encontrado mayores cantidades de Cd en el hígado y los riñones. En algunos experimentos, se encontró que aproximadamente el 75% de la carga en estos órganos. La distribución de Cd a los riñones es de particular importancia debido a que el riñón es el órgano crítico después de la exposición a largo plazo. Según algunos reportes se habla de que el 50% se encuentra en los riñones, aproximadamente el 15% en el hígado, y aproximadamente el 20% en los músculos. La concentración de Cd en la mayoría de los tejidos aumenta con la edad. (Nordberg G.F. 2007). El Cd también puede atravesar la barrera placentaria, dependiendo también de la cantidad de nutrientes que tiene la madre, tales como Cu y Zn. El Cd atraviesa la barrera placentaria fácilmente, induciendo allí la síntesis de metalotioneína, con la que forma el complejo Cd-metalotioneína, que se acumula progresivamente en la placenta durante el embarazo, actuando como mecanismo protector frente al transporte de Cd al feto. Al término del embarazo, la concentración de cadmio en la placenta es aproximadamente 10 veces más que en la sangre materna. Por

el contrario, la concentración de Cd en el cordón umbilical es alrededor de 2 a 3 veces más baja que en la sangre materna. Por ello, se infiere que el Cd puede interferir la evolución del embarazo por acción directa sobre el metabolismo de la placenta, pero no por acción directa sobre el feto. En el recién nacido el Cd en sangre es de 30 a 50% menor que el Cd en la sangre materna. La leche materna sólo secreta pequeñas cantidades (Vuori R. 1979)

Eliminación

La eliminación se lleva a cabo a través de las heces y la orina y comprenden sólo aproximadamente 0,01-0,02% de la carga de Cd total en el cuerpo. El aumento de eliminación por orina de Cd que se produce cuando aparece daño. Debido a la gran proporción (90-95%) de Cd ingerido pero no absorbido, el Cd fecal total es un indicador de la dosis de Cd ingerido; su valor es aproximadamente 50 veces mayor que la eliminación urinaria diaria. Los estudios en animales han demostrado que la verdadera eliminación de Cd en las heces es dependiente de la dosis, y es aproximadamente la misma que la eliminación urinaria (Nordberg G.F. 2007).

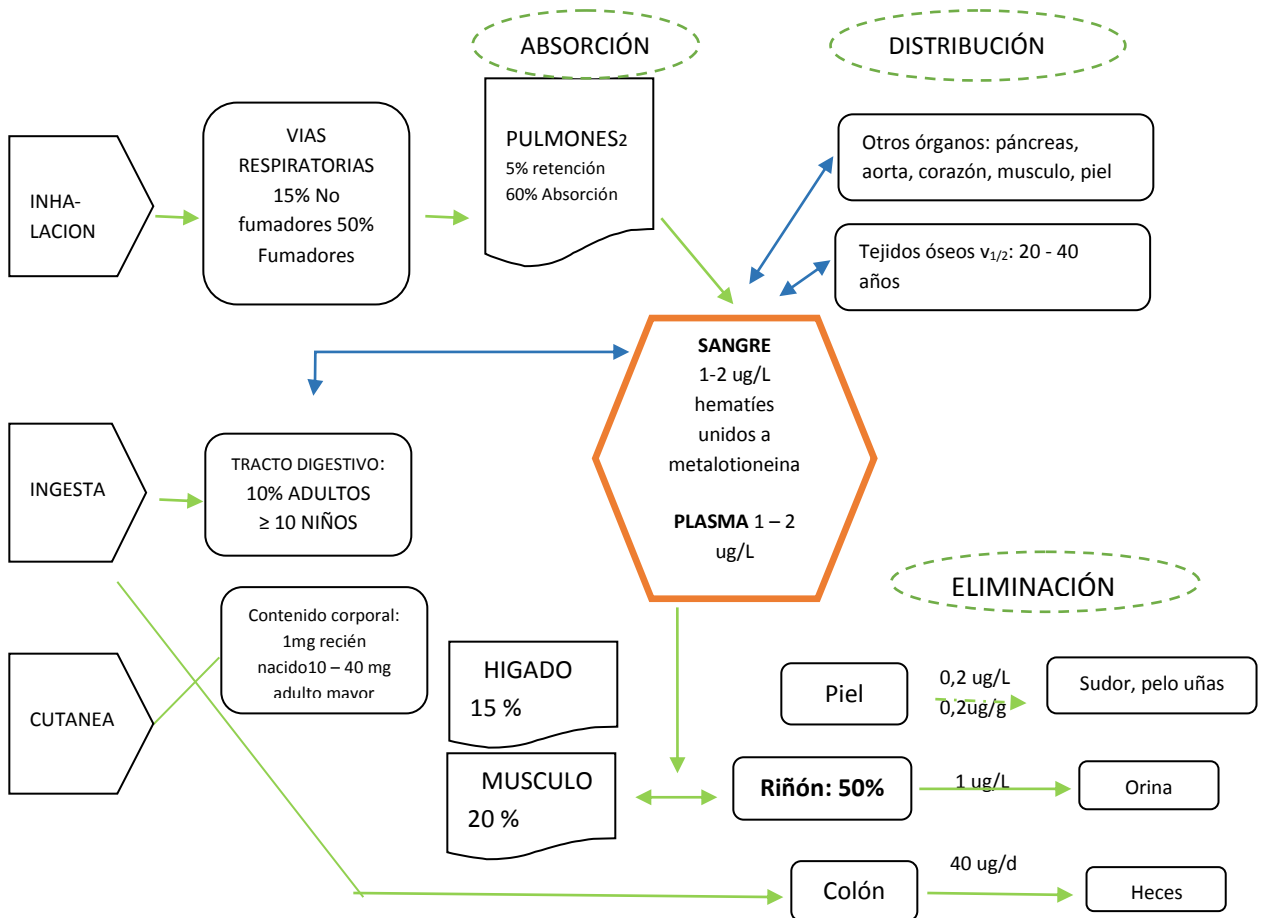


Figura No. 1. Toxicocinética del Cadmio. Adaptado de Ramírez A., 2002

1.2.2. Cd en el ambiente

Los niveles de Cd en el medio ambiente son muy variables. Como se mencionó anteriormente, las emisiones de Cd para el medio ambiente son normalmente transportados continuamente entre los tres principales compartimentos ambientales, aire, agua y suelos, sin embargo en un estado estacionario los niveles generales del metal podrían establecerse.

Las principales fuentes de exposición del ambiente (aire, suelo, agua) al Cd, está dado por fuentes naturales y antropogénicas. En el aire se encuentra eventualmente pequeñas cantidades de compuestos de Cd adheridas a partículas en el aire, algunos suelos y algunas rocas contienen Cd en diversas cantidades, generalmente pequeñas, en mayor proporción en algunos combustibles fósiles o fertilizantes. Las fuentes naturales incluyen lecho de roca subyacente o material parental transportado como glacial y aluvión. La absorción de Cd a los suelos se produce por deposición aérea y los lodos de depuradora, estiércol y la aplicación de fertilizantes de fosfato. El Cd es mucho menos móvil en suelos que en el aire y el agua. Los principales factores que regulan la especiación de Cd, adsorción y distribución en los suelos son pH, contenido de materia orgánica soluble, contenido de óxido metálico hidratado, el tipo y contenido de arcilla, la presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos, y la competencia de otros iones metálicos (OCDE 1994). El uso de fertilizantes que contienen cadmio y lodos de depuración son más citados como la razón principal para el aumento en el contenido de cadmio de los suelos en los últimos 20 a 30 años en Europa (Jensen y Bro-Rasmussen 1992).

Algunos de los valores o rangos del contenido de cadmio que se estiman como normales son mencionados en la siguiente tabla:

Ambiente	Concentración de Cd
Aire en zonas rurales	0,1 a 5 ng / m ³
Aire en zonas urbanas	2 a 15 ng / m ³
Aire en zonas industrializadas	15 a 150 ng / m ³
Exposición ocupacional	2 a 50 g / m ³
Agua –océanos	< 5 ng/L y 5.20 ng /L en orillas hasta un máximo de 110 ng/L
Sedimentos	0,2 a 0,9 mg/kg
En la corteza terrestre	0,1 a 0,5 mg/kg
Las rocas ígneas y metamórficas	0,02-0,2 mg/kg
Rocas sedimentarias	0,1 a 25 mg/kg
Reservas de agua potable	0,1 a 5,0 mg/kg
Producción de cemento	2 mg/kg
Combustibles fósiles	0,5 a 1,5 mg/kg
Fertilizantes de fosfato	10 a 200 mg/kg
Lechuga, espinacas, papa y alimentos de granos	30 a 150 µg/kg

Carne y el pescado	5 a 40 µg/kg.
Despojos de animales, tales como los riñones y el hígado	< 1.000 µg/kg
Reservas de agua potable	≤ 1 µg/kg
Agua potable	50 µg/kg
Suelo no contaminado	250 µg/kg
Sitios de desechos peligrosos	4 mg/kg
Agua de sitios de desechos peligrosos	6 mg/kg

Tabla No. 1. Valores de concentración de Cd en diferentes ambientes. *International Cadmium Association (2011)*. Disponible en <http://www.cadmium.org>

1.2.3. Toxicodinámica del Cd

Los efectos tóxicos del Cd están asociados a su reacción con grupos sulfhidrilos de enzimas y la inhibición consecutiva de la actividad enzimática. Debido a la disminución de la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo y la consecuente falta de energía, algunos procesos en las células se ven afectados. Los trastornos de metabolismo celular también dan lugar a producción de radicales libres y daña la peroxidación lipídica de las membranas celulares.

Efectos sobre la salud por exposición a Cd

La inhalación de vapores o partículas de Cd pueden ser mortales aunque los efectos pulmonares sean agudos y las muertes sean poco frecuentes. La exposición al Cd puede causar daño a los riñones. El primer signo de la lesión renal es por lo general una disfunción tubular, evidenciado por un aumento de la excreción de proteínas de bajo peso molecular (tales como β 2-microglobulina y α 1-microglobulina) o enzimas tales como N-acetil- β -D -glucosaminidasa (NAG). El daño tubular inicial puede progresar a daño renal más grave, se tiene evidencia que algunos trabajadores expuestos a Cd desarrollaron disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG). Un exceso de cálculos renales, posiblemente está relacionado con un aumento de la excreción de calcio en la orina después del daño tubular. Una alta exposición al Cd a largo plazo puede causar daño óseo; por primera vez en Japón, donde se descubrió la enfermedad de Itai-Itai (una combinación de osteomalacia y osteoporosis) en la década de 1950. La exposición fue causada por el agua contaminada con Cd utilizada para el riego de campos de arroz locales. Algunos estudios fuera de Japón han informado hallazgos similares (Järup L., 2003, Nordberg G.F. 2007).

La inhalación de humos de Cd produce irritación del sistema respiratorio, puede causar neumonitis química además de edema en los pulmones, lo que puede ser letal. La exposición crónica conduce al enfisema provocado por la disminución de la actividad de la α -1 antitripsina. La exposición larga provoca daño en los riñones. Debido a la acumulación de Cd en las células tubulares y la falta de energía y daño en las

membranas célula tubulares, provoca daño en la reabsorción tubular del calcio, fosfato, aminoácidos y algunas células de bajo peso molecular (α 1 microglobulina y β 2 microglobulina). El cadmio es un carcinógeno humano causante del cáncer de pulmón.

Biomarcadores

Los niveles de Cd en orina y Cd en sangre son indicadores de una exposición reciente. La American Conference of Governmental Industry Hygienist señala que el Cadmio en orina debe estar por debajo de 5ug/g de creatinina y el cadmio en sangre 5ug/L.

Tratamiento

Algunos fármacos quelantes que son beneficiosos para otros metales tóxicos no son la mejor opción ya que está demostrado que pueden aumentar la toxicidad del Cd movilizando e incrementando sustancialmente las concentraciones renales y la toxicidad. El monoisoamil meso 2,3 dimecartosuccinato (Mi- ADMS) parece ser un agente quelante eficaz para reducir el Cd en hígado y riñones cuando se administra en forma parental u oral.

Compartimiento	Tiempo de Vida Media
Nasofaringe y traqueo bronquios	< 24 h
Sangre	2,5 meses
Riñón	4 a 60 años
Hígado	4 a 19 años
Organismo total	30 a 40 años
Promedio del período total de absorción	14 días
Por ciento absorción gastrointestinal	5%
Excreción urinaria: vida media	10 a 40 años
Concentraciones biológicas críticas	
Corteza renal	200 a 400 μ g/g)
Riñón total:	2 a 20 mg
Hígado:	de 30 a 42 mg/g
Orina	> 5 mg Cd / g de creatinina

Tabla No. 2. Características toxicodinámicas del Cd en humano. Adaptado de Ramírez A., 2002

1.3. Plomo

El plomo (Pb) es un metal gris-azulado que se encuentra naturalmente en pequeñas cantidades en la corteza terrestre. Este metal se encuentra distribuido en el ambiente. En su mayoría proviene de actividades como la minería, manufactura industrial y de quemar combustibles fósiles. El Pb tiene muchos usos diferentes, tales como la fabricación de

baterías, municiones, productos de metal (soldaduras y cañerías) y en láminas de protección contra los rayos X. Debido a los grandes riesgos en la salud por exposición a este metal; la cantidad de Pb en pinturas y cerámicas y en materiales para recubrimientos y soldar se ha reducido considerablemente en los últimos años (ATSRD, 2007). La intoxicación por Pb ocurre luego de la exposición a este metal; este tiene muchos usos y fuentes como pueden ser baterías para autos ya mencionadas, aditivo en la gasolina, revestimiento de cables, producción de tuberías, cisternas, protección de materiales expuestos a la intemperie, fabricación de municiones, pigmentos para pinturas y barnices, fabricación de cristales, esmaltado de cerámica, litargirio, soldadura de latas, Las fundiciones de plomo, la fabricación y desarmado de baterías para autos y la industria de la cerámica constituyen la principal fuente de intoxicación laboral en nuestro medio (Valdivia M.M; 2005).

El Pb en los productos alimenticios se originó en macetas que se utilizan para la cocción y el almacenamiento, y el acetato de Pb fue utilizado anteriormente para endulzar el vino de Oporto. Durante el último siglo, las emisiones de Pb en el ambiente tienen más contaminado nuestro medio, más del 50% de las emisiones de Pb son procedentes de la gasolina. Actualmente las emisiones de los países desarrollados han disminuido considerablemente debido a la introducción de la gasolina sin Pb hace cerca de 30 años. La exposición ocupacional es debido al Pb inorgánico que se produce en las minas y fundiciones, así como la soldadura de Pb, y en plantas de baterías. Una exposición más baja o moderada puede darse en la industria del vidrio. Los altos niveles de emisiones de Pb al aire pueden contaminar las zonas cercanas a las minas y fundiciones. El Pb en el aire se deposita en el suelo y en el agua, llegando así a los seres humanos a través de la cadena alimentaria (Shibamoto T., 1993, Nordberg G.F. 2007).

El Pb se ha detectado en todos la mayoría de los alimentos analizados, incluso aquellos que han crecido lejos de las zonas industrializadas. Análisis recientes sugieren un nivel natural de Pb del orden de 0,3 ppb en algunas especies de peces. En general, los alimentos vegetales que crecen en las zonas industrializadas o cerca de autopistas de alto tráfico contienen niveles significativamente más altos de Pb que los alimentos cultivados en áreas remotas. Para los productos de origen animal, los niveles más altos de Pb se encuentran en el hueso. En promedio, la ingesta total de Pb de los alimentos se estima que estará en el intervalo de 0,2-0,4 mg/día, mientras que en el agua es aproximadamente 0,01 mg/día. Anteriormente, las latas soldadas con Pb eran una fuente bien conocida de Pb, que contaminaba los productos alimenticios tales como fórmulas infantiles, leche en polvo, jugos infantiles y alimentos para bebés; frecuentemente se encontraban niveles de Pb de hasta 0,5 ppm en estos productos. Los análisis de atún blanco indican que el tratamiento convencional de los alimentos aumenta de forma considerable los niveles de Pb en los productos enlatados (Shibamoto T., 1993, Nordberg G.F. 2007).

De manera general hasta un 50% de Pb inorgánico inhalado puede ser absorbido en los pulmones. En los adultos se puede tomar hasta 10-15% de Pb en los alimentos, mientras

que los niños se pueden absorber hasta el 50% a través del tracto gastrointestinal. El Pb en la sangre se une a los eritrocitos y la eliminación es lenta principalmente a través de la orina. El Pb es acumulado en hueso, y sólo se libera lentamente desde este compartimento corporal. La vida media en la sangre es de aproximadamente 1 mes y en hueso 20-30 años. En los adultos, el Pb inorgánico no penetra la barrera hematoencefálica, sin embargo; en los niños es menos desarrollada esta barrera y sumado a la alta absorción gastrointestinal hace a los niños especialmente susceptibles a daño cerebral por la exposición Pb. Los compuestos orgánicos de Pb penetran en el cuerpo y a las membranas celulares. El tetrametilo de Pb y el tetraetilo de Pb penetran la piel fácilmente. Estos compuestos también pueden cruzar la barrera hematoencefálica en los adultos, y por lo tanto los adultos pueden sufrir de encefalopatía asociado a la intoxicación aguda por compuestos orgánicos de Pb (*Shibamoto T., 1993, Nordberg G.F. 2007*). Este metal posee una vida media en sangre de aproximadamente 7 - 35 días, en tejidos blandos cerca de superior a 40 días y en tejido óseo entre 20 – 30 años (*Gutiérrez et al. 2004, Valdivia 2005*)

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que el plomo inorgánico probablemente es carcinogénico en seres humanos y que no hay suficiente información para determinar si los compuestos orgánicos de Pb pueden producir cáncer en seres humanos, está clasificado en el grupo 2B. Unos pocos estudios han sido publicados, la evidencia general para el Pb como un probable carcinógeno son el cáncer de pulmón, cáncer de estómago y gliomas.

1.3.1. Toxicocinética del Pb (Figura No. 2)

El grado de absorción de Pb en el tracto gastrointestinal depende de varios factores. Un factor es la forma química en la que se encuentra el Pb. Los compuestos orgánicos tales como tetraetilo de Pb se absorben fácilmente en el tracto gastrointestinal (> 90%) y finalmente se acumulan en el hueso, y en menor medida en el riñón, músculo, sistema nervioso central y el hígado. En circunstancias normales en el adulto, los compuestos inorgánicos de Pb se absorben en poca proporción en el tracto digestivo (5-10%). La absorción de Pb inorgánico en los bebés y los niños es mucho mayor, sin embargo, con estimaciones en el rango de 40-50%. El Pb absorbido se excreta principalmente en la orina (75%) y las heces (16%). La deficiencia de Fe también afecta a la absorción de Pb en el tracto gastrointestinal. La disminución de la ingesta de Zn también da a lugar a un aumento de la absorción gastrointestinal y un aumento de la toxicidad del Pb. (*Shibamoto T., 1993, Nordberg G.F. 2007*).

Absorción

La absorción es diferente dependiendo del tipo de sal de la cual se está hablando, al igual que su distribución; como es el caso de compuestos como óxidos, sales o compuestos orgánicos como el tetraetil y tetrametilo de Pb (*Córdoba 2006*). Sus principales vías de ingreso son la aérea y la oral; teniendo en cuenta que la entrada por

vía dérmica es relativamente efectiva como barrera a la entrada del toxico; teniendo en cuenta que los compuestos orgánicos de este metal pueden absorberse en niveles realmente peligrosos como es el caso del tetraetil de plomo con una dosis mortal de 700 mg/kg en conejos, siendo esta dosis seis veces mayor que por vía oral (*Córdoba 2006; Ramírez 2005*).

Por Inhalación

El Pb puede ser inhalado en forma de aerosol. El patrón de deposición de Pb inhalado en el tracto respiratorio depende del tamaño de partícula. Las partículas con un diámetro $> 5 \mu\text{m}$ se depositan principalmente en la parte superior y medias de las vías respiratorias. Estas partículas son absorbidas desde el tracto gastrointestinal cuando son inhaladas por la boca con un tamaño en el intervalo $0,01\text{-}5 \mu\text{m}$, 10 a 60% se depositan en la vía alveolar y en el caso de partículas inhaladas a través de la nariz la fracción absorbida es mucho más baja. La tasa de absorción depende de la solubilidad de las especies químicas de Pb (*Valdivia 2005*). El grado de absorción por vía respiratoria es directamente afectado por el tamaño de la partícula tóxica (menor a $5 \mu\text{m}$) así como por el volumen y la frecuencia respiratoria (*Valdivia 2005; Ramírez 2005*).

Por ingestión:

El Pb se absorbe en el tracto gastrointestinal, aproximadamente hasta un 60%. En las comidas, por las sales de Pb solubles aproximadamente un 8% son absorbidas. Después de la ingestión de Pb, éste se absorbe activamente, dependiendo de la forma, tamaño, tránsito gastrointestinal, estado nutricional y la edad; hay mayor absorción de plomo si la partícula es pequeña, si hay deficiencia de hierro y/o calcio, si hay gran ingesta de grasa ó inadecuada ingesta de calorías, si el estómago está vacío y si se es niño, ya que en ellos la absorción de plomo es de 30 a 50 % mientras que en el adulto es de 10%. Una ingesta baja en Fe se ha asociado con un aumento de absorción de Pb. La vitamina D aumenta la absorción de plomo. Otros agentes también pueden afectar la absorción de Pb (*Valdivia M.M; 2005*).

Piel: Una proporción de sales de Pb inorgánico soluble aplicadas sobre la piel es absorbida.

Distribución

Posterior a su absorción el plomo se distribuye en compartimentos (hueso, sangre y tejidos blandos). Inicialmente circula en sangre unido a los glóbulos rojos (un 95% unido a eritrocitos; posteriormente se distribuye en tejidos blandos (hígado, riñón, médula ósea y sistema nervioso central); pasado entre uno y dos meses se difunde a los huesos donde permanece inerte y no toxico (*Valdivia 2005*).

En sangre: El Pb absorbido es transportado por la sangre y distribuido en un 90% a hueso y el restante a tejidos blandos, hígado y riñón. Atraviesa fácilmente la barrera placentaria y trae también efectos deletéreos en el feto. La vida media del Pb en el

organismo es variable, según el lugar en donde se encuentra; de 3 a 4 semanas si el metal se encuentra en sangre; de 4 semanas si se depositó en tejidos blandos y de 20 a 27 años si está en tejido óseo (Arroyave C.L., 2008).

Dentro de la sangre está presente en los eritrocitos, dejando sólo una fracción de menos de 1 al 5 % libre en el plasma (Ramírez 2005). A altas concentraciones de Pb en sangre de la fracción de Pb en plasma aumenta. La razón de la unión de Pb en los eritrocitos parece ser la alta afinidad del Pb por la deshidratasa ácido δ -aminolevulínico, una enzima presente en todas las células, incluyendo los eritrocitos. Es la segunda enzima en la vía hemo; es una enzima de 250-kDa, que contiene cuatro sitios activos, cisteínas reactivas, y dos tipos diferentes de sitios de unión a Zn. El Pb puede reemplazar algo de Zn, y tiene aproximadamente 20 veces mayor afinidad por la proteína que el Zn. Tal unión causa inhibición de la actividad de la enzima (Nordberg G.F. 2007).

Biotransformación

Sólo hay indicios de que los microorganismos pueden metilar el Pb inorgánico. No se sabe si esto puede ocurrir en el tracto gastrointestinal. No hay indicios de metilación o cualquier otra biotransformación en los tejidos (Nordberg G.F. 2007). Ya absorbido el Pb, este circula unido a los glóbulos rojos, forma con los fosfatos del plasma fosfatos coloidales que son solubles y constituyen el Pb circulante y tóxico. Este se deposita en riñones, hígado, piel, glándulas y sistema nervioso central como ya se había mencionado y en huesos largos, donde puede ser movilizado nuevamente, cuando existe acidificación del pH sanguíneo (Córdoba 2006). El plomo inorgánico no se metaboliza. El metabolismo del Pb es similar al del calcio, iniciado por la acción de las enzimas el fosfato plumboso se convierte en fosfato plúmbico siendo éste aproximadamente 100 veces menos soluble, ocasionando la iniciación de los depósitos (Córdoba 2006; Nordberg 1998).

Eliminación

El Pb se excreta del cuerpo, principalmente a través de la orina y las heces; también hay otras rutas de menor de eliminación. Por orina en un 76% y en heces 16%, siendo claramente la vía urinaria la más relevante. Se menciona que existe filtración glomerular y un relativo grado de reabsorción tubular; igualmente que en los niños la vía de eliminación gastrointestinal es tan relevante como la vía urinaria (Córdoba 2006, Nordberg 2007) En exposiciones bajas, la excreción en las heces es aproximadamente la mitad que en la orina, a niveles más altos probablemente menos (Nordberg. 2007).

Riñones: La excreción en la orina se produce a través filtración glomerular, aunque la filtración es, probablemente, seguida por la reabsorción tubular parcial. Hay un ritmo circadiano en la tasa de excreción urinaria del Pb, con una disminución durante la noche. Por otra parte, la tasa de excreción se ve afectada por el flujo urinario. El Pb también se excreta a través de la bilis y jugo pancreático. Posiblemente, la excreción en la bilis es en la forma de un complejo Pb-glutación.

El Pb en cierta medida es excretado en la saliva y el sudor. Se excreta en cantidades muy mínimas como en las uñas y el pelo (Ramírez 2005). El Pb también se incorpora en el semen, la placenta, el feto y la leche.

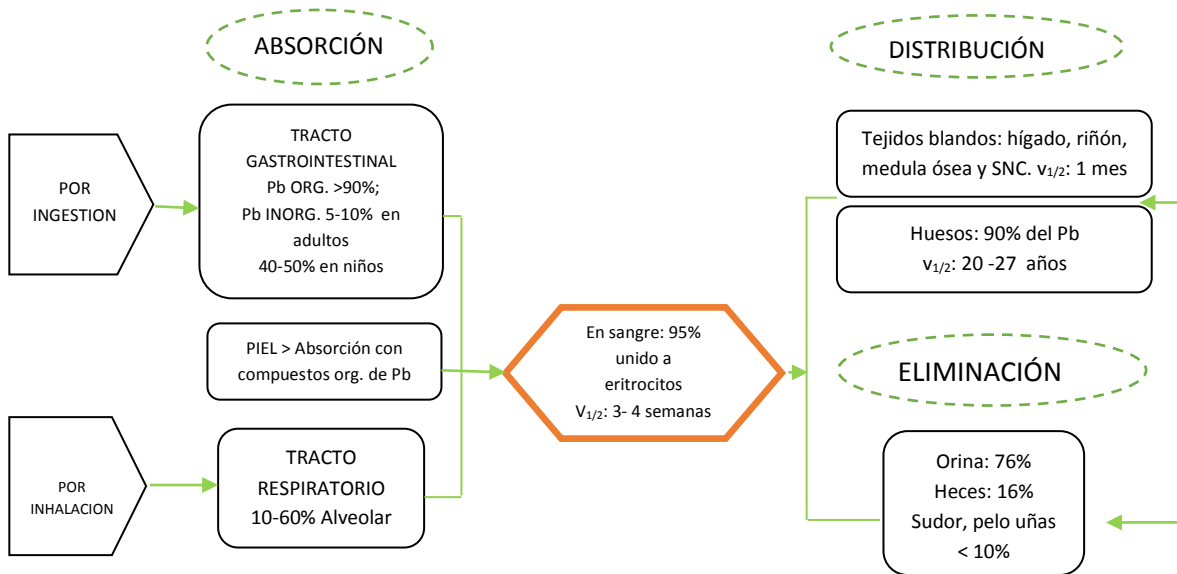


Figura No. 2. Toxicocinética del plomo en humanos. Adaptado de Ramírez 2005 y Valdivia 2005

1.3.2. Pb en el ambiente

El Pb se encuentra en el ambiente en forma natural. Sin embargo, la mayoría de los niveles altos que se encuentran en el ambiente se originan de actividades humanas. En general el Pb es poco móvil en el ambiente; se dispersa en forma de partículas por fuentes de aire y a su vez es eliminado por acción gravitacional por la lluvia; de igual manera en el suelo es poco móvil encontrándose en capas poco profundas de los subsuelos de la corteza terrestre; cuando existe mayor presencia de materia orgánica y coloides inorgánicos su interacción es mayor; de manera inversa al aumentar el pH de los suelos se disminuye la interacción y este se hace más móvil; esta movilización en el suelo dependerá del tipo de sal de Pb y de las características físicas y químicas del suelo (ATSDR 2007; ILA, 2013). En aguas el Pb es ligeramente encontrado ya que este se decanta fácilmente y se deposita en sedimentos; sin embargo, está visto que las pequeñas partículas que quedan suspendidas en la atmósfera, pueden llegar a los suelos y a las aguas a través de la lluvia ácida. En aguas superficiales provoca perturbaciones en el fitoplancton, que es una fuente importante de producción de oxígeno en los océanos y de alimento para muchos organismos acuáticos (ILA, 2013). El Pb puede permanecer adherido a partículas del suelo o de sedimento en el agua durante varios años. Es poco probable la movilización del Pb desde partículas en el suelo al agua subterránea a menos que la lluvia que cae al suelo sea ácida (ATSDR 2007; ILA, 2013).

1.3.3. Toxicodinámica del Pb

Debido a que el Pb no tiene función biológica en ningún organismo vivo; genera daños y efectos adversos en la salud cuando se tienen niveles de este metal en cualquiera de los sistemas anteriormente mencionados (*González et al. 2008*).

El mecanismo de acción está dado por la afinidad del Pb por los grupos sulfhídrico principalmente por las enzimas dependientes de zinc, inicialmente el Pb interfiere con el metabolismo del Ca cuando este está en concentraciones bajas. El Pb reemplaza el Ca comportándose como segundo mensajero intracelular, alterando la distribución de Ca en los compartimientos dentro de la célula; activa la proteinquinasa C, se une a la calmodulina e inhibe la bomba de Na-K-ATPasa, lo que aumenta el Ca intracelular (*Valdivia 2005*).

Efectos sobre la salud por exposición a Pb

Los síntomas de la intoxicación aguda por Pb son dolor de cabeza, irritabilidad, dolor abdominal y varios síntomas relacionados con el sistema nervioso. También se puede presentar encefalopatía que se caracteriza por la falta de sueño e inquietud. Los niños pueden ser afectados por alteraciones del comportamiento, aprendizaje y dificultades de concentración. En casos graves de encefalopatía, la persona afectada puede sufrir de psicosis aguda, confusión y disminución de la consciencia. Las personas que han sido expuestas al Pb durante mucho tiempo pueden sufrir de deterioro de la memoria, tiempo de reacción prolongado y disminución de la capacidad de entender. Las personas con niveles promedio de Pb en sangre menores de 3 mmol/L pueden mostrar signos de síntomas nerviosos periféricos con menor velocidad de conducción nerviosa y la reducción de la sensibilidad cutánea. Si la neuropatía es severa la lesión puede ser permanente. En los casos menos graves, el signo más evidente de la intoxicación por Pb es la perturbación de la síntesis de la hemoglobina. La exposición al Pb a largo plazo puede llevar a anemia. Investigaciones recientes han demostrado que la exposición al Pb de bajo nivel a largo plazo en los niños también puede llevar a la disminución de la capacidad intelectual (*Nordberg G.F. 2007*). Otros efectos de toxicidad son en el sistema nervioso central: cefalea, fatiga, disminución de la libido, encefalopatía, en el sistema nervioso central: debilidad motora; en el sistema renal: insuficiencia, proteinuria leve; en sangre: anemia, punteado basófilo; en el sistema gastrointestinal: náusea, constipación, pérdida de peso, dolor abdominal, anorexia; reumatológico: mialgias, gota; sistema reproductivo: oligospermia; sistema cardiovascular: hipertensión (*Valdivia 2005*).

Biomarcadores

Los marcadores de exposición como las plumbemias y las plumbemias son las más conocidas en los casos de intoxicación por Pb ya que los niveles sanguíneos son bastante importantes. La plumbemia demuestra el Pb circulante y es fugaz en la medida que el metal pasa a los depósitos. Diferentes factores modifican estos valores, como el tiempo de contacto con el metal y la toma de muestra. Algunos valores son considerados

cifras promedios en la clasificación de los pacientes: hasta un 40µg/100 ml niveles para población normal no expuesta; hasta un 60 µg/100 ml para población expuesta, entre 61 a 70 µg/100 absorción peligrosa y mayor a 71 µg/100 ml intoxicación (Córdoba 2006). De igual manera en adultos los niveles de Pb sanguíneo pueden ir hasta 25 µg/100 ml y en niños hasta 10 µg/100 ml. Para evaluar la efectividad del tratamiento con quelantes y la vigilancia de pacientes expuestos a Pb orgánico las cifras normales son hasta 150 µg/100ml (Córdoba 2006; García et al. 2010).

Entre los indicadores de efecto se encuentra el ALA-U o Ala urinario con una cifra normal de D-ALA (ácida delta amino-levulínico) hasta de 6mg/L. Las coproporfirinas hasta de 161 µg/100 ml en orina de 24 horas y la protoporfirina zinc eritrocitaria (ZPP) con valor biológico aceptado de 100 µg/100 ml como prueba de efecto (Córdoba 2006).

Tratamiento

Consiste en aislamiento de la fuente de exposición con posterior tratamiento quelante cuando la plumbemia es mayor de 60 µg/100ml o según clínica. Los quelantes usados son en general los mismos que para cualquier intoxicación plúmbica. El EDTA cálcico ha sido asociado con redistribución del plomo hacia tejido blando y cerebro, precipitando la encefalopatía plúmbica en aquellos pacientes con absorción continuada de plomo y con alta carga corporal de este metal; por lo que en estos casos se debe asociar en el tratamiento el siguiente quelante Dimercaprol (BAL) que se asocia a EDTA-Ca en casos de encefalopatía o plumbemia mayor a 100 mg/100ml en adultos y mayor a 60 mg/100 ml en niños. Ácido dimercaptosuccínico (DMSA), tiene la ventaja de que provoca pocos efectos adversos y de que se usa por vía oral (Valdivia 2005).

1.4. Evaluación de la matriz - leche

La presencia de la leche en la dieta es fuertemente administrada debido al alto contenido de proteínas y minerales esenciales este alimento para la promoción del crecimiento y el mantenimiento de la vida humana. En los tres períodos de la vida, la leche es importante durante la: 1) durante la infancia, el suministro de proteínas, minerales y grasas para apoyar el desarrollo del cuerpo; 2) durante la adolescencia, ofrece condiciones para un rápido crecimiento de la construcción de los músculos consistentes, huesos y sistema endocrino, y 3) para las personas de edad avanzada representa una fuente de Ca esencialmente para mantener la integridad de los huesos. (Acosta N.M 2011; Pereira J.S.F.). Las tasas de crecimiento en el primer año de vida y en la edad de la adolescencia son los más altos en todo el período de vida de una persona, y la cantidad diaria de leche es de 1 litro por día para los adolescentes de edades comprendidas entre 11 y 18 años. La composición media de la leche en términos de porcentaje es: agua 85,8; lactosa 4,9; grasa 3,9; proteína 3,5, y sales 0,9. La importancia de cada componente representa la necesidad diaria para el cuerpo (Pereira J.S.F.).

Como la leche (principalmente de vaca) es un componente esencial de la dieta posterior de los lactantes, la calidad de ella influye en la continuidad de la salud de los niños y los

adolescentes. Por lo que es necesario que la leche sea obtenida a partir de animales sanos, que las prácticas de recolecta y almacenado estén en condiciones satisfactorias libres de contaminación del medio ambiente (*Pereira J.S.F.; Acosta N.M. 2011*). La leche contiene más de 300 constituyentes nutricionales necesarios para el crecimiento y desarrollo del neonato e infante como son lípidos, proteínas, vitaminas y minerales; dentro de los minerales podemos encontrar algunos metales que resultan esenciales en nuestra dieta como pueden ser el Fe, Co, Cu, Mn, Mo y Zn; sin embargo, existen otros metales que no cumplen función biológica alguna conocida y es mejor evitarlos siempre, tal es el caso del Hg, Pb, Cd entre otros (*Pereira J.S.F.; Acosta N.M. 2011*).

El creciente interés sobre el contenido de estos metales esenciales o contaminantes en la leche va en función de su uso como indicador de calidad, cuyo objetivo real es asegurar y así poder ofrecer al consumidor una leche con buena riqueza nutricional y segura. El consumo de leche que contenga metales contaminantes o tóxicos en cantidades superiores a los niveles permitidos por las autoridades sanitarias puede favorecer la aparición de trastornos de la salud tanto en animales como en el hombre. Algunos de los signos y síntomas generales pueden ser la pérdida del apetito, cuadros de anemia, un crecimiento retardado o la disminución de los índices productivos y reproductivos (*Ataro A., 2008; Pereira J.S.F.; Acosta N.M. 2011*). También se considera que pueden causar una alteración del sistema inmune, así como en casos específicos la presentación de alteraciones mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas y abortos; dichos síntomas varían de acuerdo a la exposición, a la dieta, al tipo de metal expuesto entre otras muchas variables. Los niños han demostrado ser la población más sensible a Cd y Pb que los adultos. Por lo tanto, es importante vigilar los niveles principalmente de elementos tóxicos en la leche de consumo humano, que forma una fuente importante de nutrición en la infancia (*Ataro A., 2008*).

La leche bovina es un alimento con alto valor nutricional un alimento y su composición varía en función de la raza, alimentación, edad, período de lactación, época del año y sistema de ordeño, entre otros factores. Como principal componente tiene el agua, al cual le sigue fundamentalmente la grasa, proteínas e hidratos de carbono; además contiene, diferentes proporciones de minerales (P, Ca, Zn y Mg) y de vitaminas (A, D, B2, B1, B6 y B12) (*Ataro A., 2008*).

De acuerdo a Acosta N.M et. al del Instituto Nacional de Salud uno de los peligros más relevantes que afectan la leche, se mencionan los microorganismos patógenos, la presencia de toxinas, las sustancias químicas tales como residuos de plaguicidas usados en la producción agrícola de forrajes y en control de plagas que afectan los cultivos, residuos de medicamentos veterinarios usados para el manejo sanitario de los bovinos, metales pesados, los cuales pueden causar alteración microbiológica y físico-química en este producto.

De acuerdo a organizaciones como la FAO y OMS indican que la presencia de compuestos o sustancias químicas que son potencialmente dañinos para los

consumidores requieren una alta importancia de realizar estudios de evaluación de riesgos en peligros químicos en alimentos (Acosta N.M, 2011).

La contaminación de la leche con diferentes tóxicos puede darse durante el proceso de producción dado que el bovino puede estar expuesto a trazas de metales pesados, dioxinas, furanos, bifenilos policlorados e hidrocarburos aromáticos policlorados (Acosta N.M, 2011). Igualmente puede contaminarse con residuos de plaguicidas y toxinas presentes en los piensos y pastos con que son alimentados o con residuos provenientes de medicamentos veterinarios aplicados al bovino (Acosta N.M, 2011).

La fuente de los contaminantes químicos que pueden llegar al bovino y excretarse en la leche como se presenta en la siguiente figura:

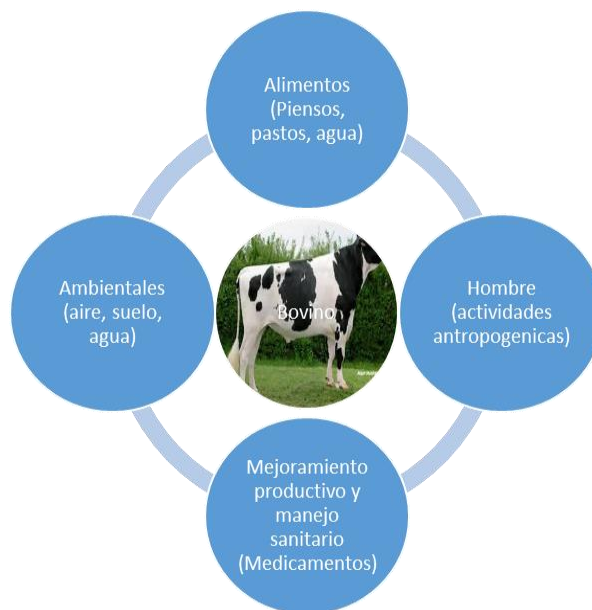


Figura No. 3. Fuentes de contaminantes químicos en la leche. Adaptada de Acosta N.M 2011

Dentro de los contaminantes ambientales se encuentran los metales pesados, dioxinas, furanos, bifenilos policlorados e hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales derivan tanto de fuentes naturales como de actividades antropogénicas (procesos industriales, manejo de desechos sólidos y líquidos, actividades agrícolas) entre muchas otras fuentes. Estas actividades han favorecido la emisión de estos agentes contaminantes hacia los ecosistemas, lo que puede conllevar a su incorporación en los alimentos como la leche (Acosta N.M, 2011).

Los contaminantes metálicos se encuentran en todos los medios ambientales (suelo, agua y aire) y pueden provenir de diferentes fuentes como baterías, lodos, emisiones del transporte, pinturas, textiles, industrias metalúrgicas, combustión de materiales calefactores, fertilizantes y curtiembres entre otros. Algunas industrias, durante sus

procesos de producción, han sido emisoras de metales pesados al medio ambiente durante muchos años; tal y como ya se ha mencionado a lo largo de este texto (Acosta N.M, 2011).

Debido a las diversas fuentes de contaminación ambiental, la leche es susceptible a contaminarse con los metales pesados y metaloides como As, Cd, Pb, Hg, Se y Zn. Estos pueden llegar al animal por consumo directo de agua contaminada o indirecto por regadío de pastos y contaminación del suelo. Sin embargo, la concentración varía en función de las actividades humanas cercanas a las áreas de producción (Acosta N.M, 2011).

En la búsqueda realizada en el contexto nacional, no se identificaron reportes de envenenamiento con leche contaminada con metales pesados. En el país no está permitida la utilización de As en herbicidas, insecticidas, medicamentos veterinarios ni en sales mineralizadas (Acosta N.M, 2011).

1.5. Análisis contexto nacional

En Colombia la leche bovina es utilizada por la mayoría de madres lactantes como complemento de la alimentación del bebé; de acuerdo con la información reportada por la encuesta ENSIN 2005 cerca del 70 % la población infantil entre los 6 y 23 meses de la zona rural consume leche, mientras en la zona urbana el porcentaje de niños se acerca a al 80% (Acosta N.M, 2011). Finalmente, es necesario resaltar como ya se ha mencionado que la leche bovina es consumida por todos los grupos etáreos de la población, con lo cual los grupos de alto riesgo como los niños, mujeres gestantes y ancianos están expuestos a los peligros presentes en este alimento generando un alto riesgo en salud pública (Acosta N.M. 2011).

Por su parte, según la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) en el año 2009, se produjeron diariamente 15.752.509 litros de leche en el país, de los cuales el 81% fue comercializada en un 41% a la industria, 36% a los intermediarios y 4% a los demás. Del 19% restante, 9% fue procesado en finca y el otro 10% consumido en la misma (MADR/CCI; 2009). Aparentemente se estima que la producción de leche líquida en el país para el año 2010 correspondió a 17.219.523 litros diarios (Acosta N.M. 2011; MADR/CCI; 2009)..

Producción Lechera en Colombia

En Colombia se presentan dos tipos de sistemas de producción de leche, el especializado (LE) y el doble propósito - DP (Carne y Leche), cada uno establecido en regiones diferentes del territorio nacional. El sistema productivo especializado en leche se localiza en las zonas del trópico alto (altiplano cundiboyacense, altiplano nariñense, altiplano norte y nordeste de Antioquia) donde la temperatura ambiente se encuentra en promedio entre 12 y 15°C. Este sistema se caracteriza por presentar la mayor adaptación de las razas Bos taurus (Holstein, Jersey, Normando, Pardo Suizo, Guernsey y Ayrshire),

un uso intensivo de los factores de producción (tierra, capital y mano de obra), uso de fertilizantes, riego, rotación de praderas, utilización de suplementos alimenticios y ejecución de dos ordeños en el día (*Acosta N.M, 2011; Valderrama P.A., 2003*)

El sistema de doble propósito es característico de zonas tropicales bajas; frecuentemente se encuentra en zonas marginales distantes y con pobre dotación de recursos biofísicos y de infraestructura física. Se localiza principalmente en las regiones Caribe, eje cafetero y de los llanos orientales. En este sistema predominan las razas Normando y Gyr además de los cruces de *Bos indicus* con *Bos taurus*. El sistema de producción es extensivo basado en pasturas de mala calidad nutricional que limita la productividad y rentabilidad. La producción puede estar destinada a autoconsumo, comercialización como leche cruda o industrialización (*Acosta N.M, 2011; Valderrama P.A., 2003*).

De acuerdo al Conpes 3576 la producción de leche en Colombia ha venido creciendo significativamente, pasando de 3.917 millones de litros en 1990 a 5.757 millones de litros en 2008, que representaron el 25% del producto interno bruto (PIB) pecuario y el 10,2% del PIB Agropecuario para este último año. En cuanto a la comercialización, del total de la producción de leche nacional el 43% se comercializa informalmente, mientras que la industria acopia el 32%, las cooperativas el 15% (de los cuales Colanta participa con el 80%) y el restante 10% se destina al autoconsumo en finca (*Conpes 3576; Valderrama P.A., 2003*).

Colombia es el tercer productor de leche en Sur América, el sexto en América y el 23º en el mundo. Presenta un rendimiento promedio de 6,1 kg/día lo cual representa un grave limitante para la competitividad si se tienen en cuenta algunos referentes internacionales como Argentina con 15.6 L/vaca/día o Estados Unidos con 30.6 L/vaca/día. No obstante, Colombia fue el país que presentó la mayor tasa de crecimiento promedio anual con el 8,4%, entre los años 2000 y 2008, a causa del inicio de mejoras en los suplementos nutricionales y de la aplicación de los resultados de la investigación en genética de la población bovina (*Valderrama P.A., 2003*).

Por su característica de liposolubilidad, la leche es un medio de fácil contaminación por agentes externos de tipo químico tales como gases emitidos a la atmósfera, residuos industriales, residuos de medicamentos, micotoxinas, residuos de plaguicidas, entre otros. Varias de las sustancias químicas incluidas en los grupos anteriores persisten en el ambiente, son resistentes a la degradación y pueden pasar al bovino, acumularse en tejidos, como en la grasa, y eliminarse por las secreciones del animal dentro de las que se encuentra la leche. A diferencia de los peligros biológicos, cuyo recuento puede disminuir durante la cadena productiva mediante procesos tecnológicos (temperaturas y otras medidas de inactivación), los peligros químicos varían poco y se mantienen hasta el producto terminado y comercializado (*Acosta N.M, 2011*).

Muchas de las fuentes de contaminación química están relacionadas con factores a los que está expuesto el bovino provenientes del medio ambiente (agua, aire, suelo), la alimentación animal (concentrado, heno, pradera, ensilaje y otros), los procesos relacionados con el mejoramiento productivo y el manejo sanitario del animal (control de

enfermedades y parásitos en el animal; control de insectos en los establos, etc.). Estos contaminantes pueden llegar al animal principalmente por ingestión, contacto directo o administración (medicamentos veterinarios) (Acosta N.M, 2011).

A nivel nacional la alimentación está constituida por forrajes de pastoreo debido a que es una práctica económica con poco empleo de poca mano de obra, en los sistemas de producción bovina. Sin embargo, esta actividad se ve afectada tanto por condiciones químicas y físicas del suelo y variaciones climáticas. A través de los forrajes y de los suelos contaminados, pueden transferirse al animal sustancias químicas como metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos. También, el uso de plaguicidas y abonos en la producción agrícola deja residuos en el suelo que luego son absorbidos por los pastos y piensos que consumen los animales; igualmente, los alimentos concentrados y piensos destinados para la alimentación del ganado lechero pueden contaminarse con micotoxinas principalmente por deficiencias en su almacenamiento (Acosta N.M, 2011).

En Colombia, hasta el momento, se cuenta con reglamentación oficial de niveles máximos de metales en leche normados en el decreto 4506 de 2013, por otro lado, en la tabla siguiente se muestran los valores de referencia de ingesta semanal tolerable provisional por consumo de estos contaminantes:

ISTP (Ingesta Semanal Tolerable Provisional)	Metal o metaloide
0,015 mg/kg de peso corporal	As
7 µg/kg de peso corporal	Cd
50 µg/kg de peso corporal	Pb
1,6 µg/kg de peso corporal	Metilmercurio

Tabla No. 3. Ingesta Semanal tolerable provisional de algunos metales y metaloides

Es de vital importancia enmarcar que el desarrollo de este trabajo se llevó en la ciudad de Bogotá; por lo tanto las zonas de mayor conexión con las leches comercializadas a nivel Bogotá es la zona cundiboyacense. Los Valles de Ubaté y Chiquinquirá han sido una región lechera reconocida principalmente por su riqueza agroecológica y por la adaptación de razas de ganado bovino con alto potencial lechero, por tal tanto desde hace varias décadas una de las principales actividades de la zona consiste en la comercialización de leche y la fabricación de muchos de derivados lácteos (Valderrama P.A., 2003).

La carretera central que une a la Microcuenca con la Sabana de Bogotá es una vía que pasa por los municipios de Ubaté, Susa, Capellanía (Corregimiento de Fúquene), Simijaca y Chiquinquirá. Otras vías importantes para la comercialización de leche fresca son: entre Simijaca y San Miguel de Sema, entre Chiquinquirá y San Miguel de Sema y entre Ubaté y Lenguaque. A continuación se muestra la participación de este sector en el mercado de Bogotá; lo que indica el crecimiento durante la última década (Valderrama P.A., 2003).

Municipio	1990	1994	2001
<i>Ubaté</i>	125.080	203.990	224.000
<i>Fúquene</i>	-	-	10.000
<i>Simijaca</i>	70.000	142.205	243.000
<i>Chiquinquirá</i>	43.000	171.778	70.000
<i>San miguel de sema</i>	-	-	40.000
<i>Total</i>	238.080	517.973	582.000

Tabla N. 4. Participación en el mercado de Bogotá D.C. (Litros/día) (Valderrama P.A., 2003).

La cadena láctea en esta zona está estructurada por las siguientes actividades: producción primaria, transporte, acopio (enfriamiento), transporte en frío, transformación o procesamiento, y distribución. Como agentes de la cadena se pueden definir los productores, intermediarios, enfriadores, industriales, comercializadores de leche cruda y de queso, distribuidores y consumidores de acuerdo de a Figura No. 4.

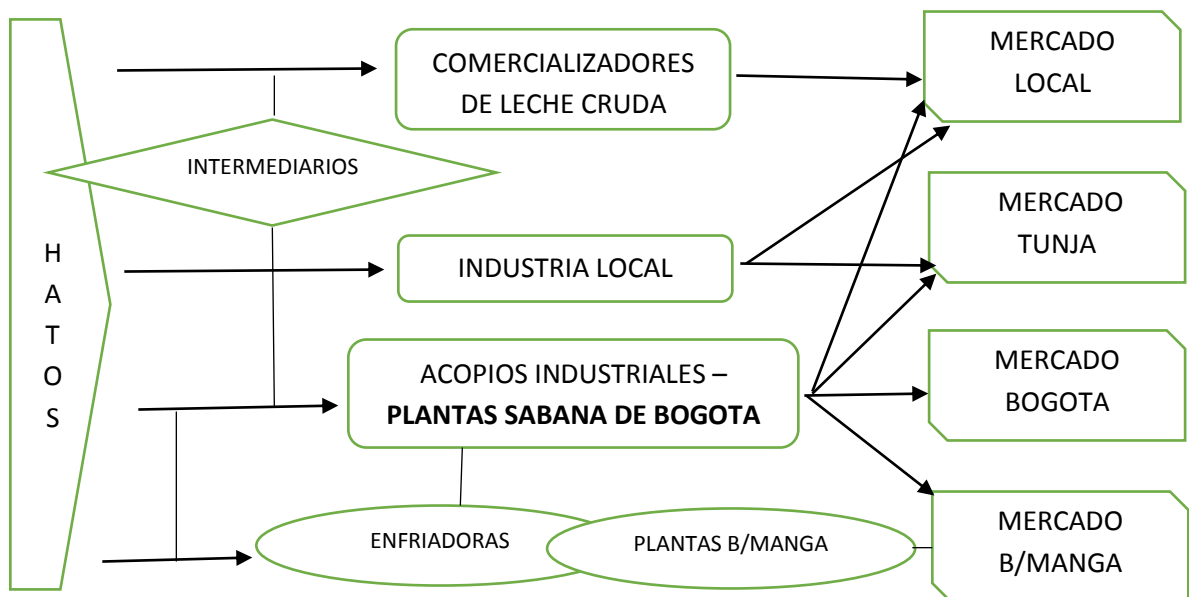


Figura No. 4. Comercialización de leche en la microcuenca de Valle de Ubaté y Chiquinquirá. Importancia de comercialización en el mercado de Bogotá. Adaptado de Valderrama P.A., 2003

1.6. Método analítico

1.6.1. Métodos para determinar Metales en Alimentos

Hoy en día existen diversos métodos analíticos disponibles para el análisis de minerales y elementos traza en los alimentos. En gran parte la elección del método analítico, depende de la instrumentación disponible, la experiencia del laboratorio y los niveles de concentración del analito requeridos. Los parámetros que se deben considerar para la selección de una técnica analítica incluyen: el límite de detección y de sensibilidad, la precisión analítica, el rango de trabajo analítico, los problemas con las interferencias, el costo del instrumento, el rendimiento de muestras, la posibilidad de automatización y los conocimientos y aptitudes del operador a cargo. Algunos de los métodos más frecuentemente utilizados son los mencionados posteriormente al igual que una muy breve explicación de ellos se detalla:

- ✚ *Espectrofotometría UV-Vis*
- ✚ *Fluorometría*
- ✚ *Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES)*
- ✚ *Espectrometría de masa de plasma acoplado Inductivamente (ICP- MS)*
- ✚ *Espectrometría de absorción atómica (AAS)*
- ✚ *Espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS)*
- ✚ *Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GFAAS)*
- ✚ *Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros (HGAAS)*

Espectrofotometría UV-Vis

Fue la técnica más común para el análisis de metales en los alimentos; sin embargo ha perdido importancia en años recientes debido al desarrollo de nuevas técnicas tales como la espectrometría de absorción atómica. Se basa en la relación entre la absorción de la radiación visible o ultravioleta cercana de una solución y la concentración de las especies coloreadas en la solución. El analito tiene que ser convertido a un complejo coloreado antes del análisis. La instrumentación básica es todavía relativamente simple y de bajo costo en comparación con los instrumentos que se requieren para las otras técnicas de análisis de metales. El método puede automatizarse fácilmente para el análisis rutinario y da resultados con una buena sensibilidad y precisión. Las desventajas de esta técnica son que a menudo se requiere un control estricto del pH y un estado de oxidación específico y también puede haber problemas con la interferencia de otros metales (Skoog D.A. 2001).

Fluorometría

El método es relativamente barato y es muy sensible, varios órdenes de magnitud mejor que la espectrofotometría UV-Vis. Se utiliza frecuentemente para la determinación de

elementos traza en muestras biológicas y en alimentos que son más difíciles de analizar con otras técnicas. Algunos metales pueden ser transformados en complejos orgánicos asociados con iones o quelatos fluorescentes que tienen la característica de absorber luz de una longitud de onda y en su lugar emitir luz de otra longitud de onda. La luz emitida o fluorescencia es proporcional a la concentración del análisis (Koh T.S. & Benson T.H., 1983)

Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES)

La ICP-AES es una técnica multielemento que permite el análisis simultáneo de un gran número de elementos. Se basa en la medición de la radiación de la línea espectral emitida por átomos excitados en un plasma de Ar generado por calentamiento inductivo con un campo electromagnético de alta frecuencia. Los principales componentes de un instrumento ICP-AES son la antorcha plasmática, el nebulizador y el policromador. La antorcha consiste en 3 tubos concéntricos de cuarzo rodeados por una bobina de inducción enfriada por agua conectada a un generador de alta frecuencia. El plasma es creado al hacer que el Ar sea conductivo al exponerlo a una descarga eléctrica que crea electrones e iones. Bajo la influencia del campo electromagnético de alta frecuencia, las partículas cargadas calientan el Ar hasta que el plasma alcanza una temperatura de 5500-8000 °K. Esto lleva a una vaporización casi total del análisis y a una alta eficiencia de atomización. La muestra solubilizada es introducida vía nebulizador dentro de la antorcha utilizando un flujo transportador de Ar de 1 L/min. Para el gas que enfría se requiere de un flujo de gas mucho mayor, por lo general, 10 L/min. La técnica más común de introducción de la muestra es vía nebulizador. Se utilizan varios tipos de nebulizadores para generar aerosoles a partir de muestras líquidas: nebulizador concéntrico, nebulizador Babington, nebulizador de flujo cruzado y nebulizador ultrasónico. Cada tipo de nebulizador presenta características diferentes respecto a eficiencia, tolerancia a altas cargas de sales y estabilidad. Son muchas las técnicas de introducción de la muestra en la ICP-AES además de los nebulizadores convencionales: nebulización termo-spray, evaporación electrotérmica, generación de hidruros y muestra sólida directa utilizando ablación laser (*Vandecasteele 1993*).

Las interferencias espectrales de los elementos de la matriz, de especies moleculares o del gas argón son algunas desventajas del espectro de emisión de ICP lo que hace complejo su análisis. Estas pueden ser minimizadas utilizando espectrómetros de alta resolución. El alto costo del sistema y funcionamiento de este éste debido al alto consumo de Ar es otra gran desventaja. Sin embargo, ICP-EAS ha encontrado una gran aplicación en el análisis de alimentos debido a su muy alto rendimiento de muestras (*Vandecasteele 1993*).

Espectrometría de masa de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

Es una técnica analítica relativamente nueva comparada con los métodos ya descritos, se ha posicionado como una de las técnicas más útiles y versátiles para la determinación de trazas en el análisis de alimentos. La ICP-MS surge de combinar la capacidad multielemento y el amplio rango de trabajo lineal de la ICP-EAS con los límites de detección excepcionalmente bajos de la GFAAS (*Vandecasteele 1993*). Aquí en esta técnica, se combina una fuente de ion plasma a alta temperatura y a presión atmosférica con un espectrómetro de masa bajo vacío como un detector sensible. El plasma acoplado inductivamente se genera tal como se describe anteriormente para ICP-EAS. Los iones producidos en el plasma son muestreados en una dirección axial a través de un orificio estrecho (aproximadamente 0,7-1,2 mm de diámetro) dentro de un interfaz bombeado diferencialmente con lentes electroestáticos y desde allí extraídos hacia el analizador de masa. Para la mayoría de los tipos de ICP-MS, se utiliza un cuadrupolo para la separación de masa, pero recientemente se encuentran disponibles instrumentos de sector magnético de alta resolución (*Vandecasteele 1993*). Los iones transmitidos son detectados por un multiplicador de electrones "fuera de eje", el cual puede operarse en los modos análogo y/o conteo de pulso. La captura de los datos puede hacerse en los modos de exploración (scanning) o de pico. En el primer modo, se explora la región de la masa con los isótopos de interés mientras que en el modo de pico sólo se miden los iones preseleccionados. La forma más común de introducir la muestra es la inyección directa de soluciones utilizando un nebulizador neumático y una cámara "spray". Se dispone de una variedad de tipos diferentes de nebulizadores similares a aquellos utilizados por la ICP-EAS. Debido a la alta temperatura del plasma, los compuestos del análisis en el aerosol son disociados eficientemente, atomizados y se forman iones con una carga positiva. Más de 50 elementos son ionizados a M^+ en una proporción de $> 90\%$ (*Vandecasteele 1993; Nardi E.P. et. al 2009*). Desafortunadamente, también se producen picos de iones de óxidos (MO^+), iones cargados doblemente e iones poliatómicos (por ejemplo $ArNa^+$) ya sea a partir del análisis, la matriz de la muestra o del solvente. Estos picos complican el espectro y pueden causar serias interferencias espectrales si ocurren en masas de iones con carga individual. La ICP-MS también sufre de efectos de la matriz, por ejemplo la matriz induce cambios de la intensidad de la señal iónica especialmente en concentraciones de > 1 g/L de sólidos disueltos. En altas concentraciones de sales, pueden observarse efectos de la matriz tales como supresión de la ionización o efectos de carga espacial. Se utilizan diversos métodos para corregir o superar estos efectos de la matriz: dilución de la muestra, compatibilización de la matriz, uso de un estándar interno, adición de estándar, separación química dilución isotópica (*Nardi E.P. et. al 2009*).

Los LD de los instrumentos con cuadrupolo para la mayoría de los elementos son menores a $0,1 \mu\text{g/L}$ y por lo tanto, considerablemente más bajos que aquellos para la ICP-EAS ($0,1-100 \mu\text{g/L}$). Los instrumentos de sector magnético de alta resolución permiten LD inferiores a $0,05 \text{ ng/L}$. Otra ventajas, incluyen un rendimiento de muestras

extremadamente alto (>100 muestras/día) y la disponibilidad de información isotópica. La gran desventaja de la ICP-MS consiste en el alto costo del instrumento y de funcionamiento (derivado principalmente de un gran consumo de gas Ar) y la existencia de interferencias isobáricas en el rango de masa baja (< 80 urna) (*Nardi E.P. et. al 2009*).

1.6.2. Generalidades de Espectrofotometría de Absorción Atómica

El término espectroscopia significa la observación y el estudio del espectro, o registro que se tiene de una especie tal como una molécula, un ion o un átomo, cuando estas especies son excitadas por alguna fuente de energía que sea apropiada para el caso. En el campo de la espectroscopia los científicos Kirckhoff y Bunsen son los pioneros ya que desarrollaron un espectroscopio en el periodo de 1860 a 1870, y allí pudieron observar las líneas de emisión de diferentes elementos químicos en la flama y relacionaron las líneas con la identidad del elemento (*Rocha C.E., 2000; Skoog D.A. 2001*). De acuerdo a su experiencia cada metal que emite radiación de diferente color, presenta líneas que aparecen en diferentes posiciones en la pantalla o campo de observación, y esto es independientemente de las condiciones en que se realiza el experimento así como de la naturaleza de la sal metálica y únicamente depende del metal. En su experimento se dieron cuenta que adicionalmente la intensidad de la línea está directamente relacionada a la concentración del elemento en solución; y de esta manera se tiene una forma inequívoca de identificar el elemento (*Rocha C.E., 2000; Skoog D.A. 2001*).

La espectrofotometría atómica se puede dividir en tres clases:

Espectrofotometría de Emisión Atómica (EEA), Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) y Espectrofotometría de Fluorescencia Atómica (EFA)

Los átomos libres producidos en un atomizador a partir de una muestra (llama u horno de grafito calentado eléctricamente) pueden absorber radiación de su longitud de onda específica de resonancia generada por una fuente externa, por ejemplo un cátodo hueco o una lámpara de descarga sin electrodos. Si la luz de esta longitud de onda específica pasa a través del atomizador que contiene el vapor atómico del elemento, parte de la luz será absorbida, y el grado de absorción será proporcional a la densidad de átomos en el paso de la luz. La técnica hace uso de la espectrofotometría de absorción para evaluar la concentración de un análito en una muestra y se basa en gran medida en la ley de Lambert-Beer. Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución (*Abril et al. 2010; Rocha C.E., 2000; Skoog D.A. 2001*):

$$A = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; también depende de

la distancia que recorre la luz por la solución –a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará-; y por último, depende de ϵ , una constante de proporcionalidad -denominada coeficiente de extinción- que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de ϵ dependen de las de c y l . La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de ϵ resultan ser $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar (ϵM) (Abril et al. 2010).

En resumen, los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía (es decir, luz de una determinada longitud de onda). Esta cantidad de energía (o longitud de onda) se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible, a partir de la ley de Lambert - Beer, calcular cuántas de estas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide (Abril et al. 2010; Rocha C.E., 2000; Skoog D.A. 2001).

Para analizar los constituyentes atómicos de una muestra es necesario atomizarla. La muestra debe ser iluminada por la luz. Finalmente, la luz es transmitida y medida por un detector. Con el fin de reducir el efecto de emisión del atomizador (por ejemplo, la radiación de cuerpo negro) o del ambiente, normalmente se usa un espectrómetro entre el atomizador y el detector. En los instrumentos de EEA, la flama atomiza y excita los componentes de la muestras. Estos emiten radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda que son separadas en el monocromador y la línea de interés llega al detector, al amplificador y finalmente al sistema de lectura (Abril et al. 2010; Rocha C.E., 2000; Skoog D.A. 2001).

Los componentes instrumentales de un equipo de espectrofotometría de absorción atómica son los similares a los de un fotómetro o espectrofotómetro de flama, excepto que en EAA se requiere de una fuente de radiación necesaria para excitar los átomos del análisis. A continuación se muestra un esquema de un EAA.

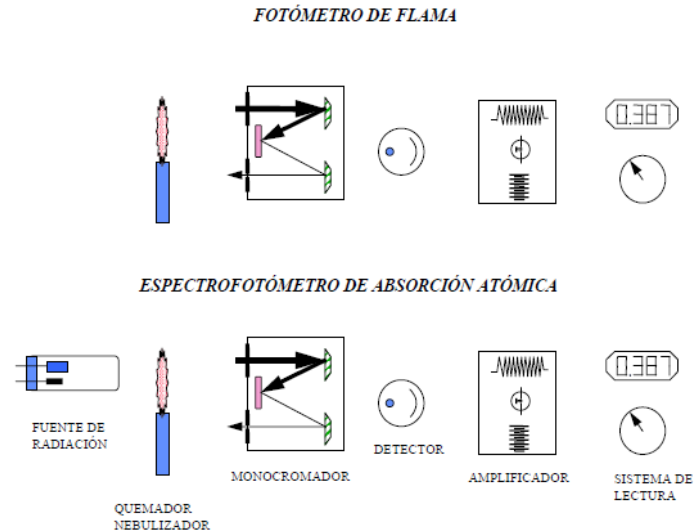


Figura No. 5. Esquema de un fotómetro de llama y de un espectrofotómetro de absorción atómica. Tomado de Rocha Edmundo. Facultad de ciencias químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua

Los componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica son (Rocha C.E., 2000; Skoog D.A. 2001):

- ✚ Una fuente de radiación que emita una línea específica correspondiente a la necesaria para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.
- ✚ Un nebulizador, que por aspiración de la muestra líquida, forme pequeñas gotas para una atomización más eficiente.
- ✚ Un Quemador, en el cual por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión misma, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.
- ✚ Un sistema óptico que separe la radiación de longitud de onda de interés, de todas las demás radiaciones que entran a dicho sistema.
- ✚ Un detector o transductor, que sea capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente.
- ✚ Un amplificador o sistema electrónico, que como su nombre lo indica amplifica la señal eléctrica producida, para que en el siguiente paso pueda ser procesada con circuitos y sistemas electrónicos comunes.
- ✚ Por último, se requiere de un sistema de lectura en el cual la señal de intensidad de corriente, sea convertida a una señal que el operario pueda interpretar (transmitancia o absorbancia).

Espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS)

La muestra "solubilizada" se aspira vía un nebulizador dentro de la llama de aire/acetileno o N₂O/acetileno donde se evapora el solvente y los sólidos remanentes se separan en átomos. La FAAS no es muy susceptible a los efectos de la matriz, aunque pueden encontrarse interferencias (*Abril et al 2010; Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Los errores debido a interferencias físicas se pueden reducir mediante la compatibilización de la matriz. Las interferencias de ionización se encuentran cuando el grado de ionización del análito en la llamarada es diferente para las muestras que para los estándares debido a que los átomos e iones no absorben en la misma línea espectral. Los elementos alcalinos y alcalinotérreos se ven especialmente afectados por esta interferencia (*Abril et al 2010; Kastenmayer 1995; Skoog 2001*). Las interferencias de ionización pueden ser reducidas al agregar un supresor de la ionización, el cual proporciona una alta concentración de electrones para suprimir la ionización del análito. Las interferencias químicas en la FAAS son causadas a menudo por aniones que forman compuestos de baja volatilidad como por ejemplo óxidos refractarios (B, Al, Fe o V), fosfatos y sulfatos (Mg, Ca). Tales interferencias pueden eliminarse en algunos casos al agregar una agente liberador que reacciona preferencialmente con las especies que interfieren y evita su reacción con el análito. En casos donde no pueda eliminarse la interferencia, deberá emplearse la técnica de adición de estándar para obtener resultados exactos (*Abril et al 2010; Kastenmayer 1995; Skoog 2001*). La FAAS es probablemente la técnica más ampliamente utilizada para el análisis de metales en alimentos debido a su alto rendimiento de muestras, simplicidad y el bajo costo de su instrumentación. Permite la determinación de la mayoría de los elementos traza en los alimentos en el rango de mg/kg con una precisión de 0,3-1% (a absorbancias > 0,1-0,2) y una exactitud de aproximadamente 0,5-5% (*Abril et al 2010; Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Espectrofotometría de absorción atómica por generación de hidruros (HGAAS)

En esta técnica, el análito es reducido a su hidruro volátil, transferido mediante una fuente de gas a una celda de cuarzo caliente, descompuesto y atomizado. La separación del análito reduce en gran medida las interferencias de la matriz de tal modo que pueden determinarse niveles de concentración en µg/kg. Cuando la cantidad de la muestra es un inconveniente, puede emplearse inyección de flujo que permite analizar volúmenes de muestra tan pequeños como 100 µl. Las desventajas son que requiere de un tratamiento especial después de la digestión de la muestra para generar un estado de oxidación específico para la formación del hidruro y ciertos metales (por ejemplo Cu, Fe) pueden interferir con la formación del hidruro (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Espectrofotometría de absorción atómica de horno de grafito (GFAAS)

El desarrollo de atomizadores de grafito en barras amplió el poder de detección de la AAS para un amplio rango de elementos dentro del rango de $\mu\text{g}/\text{kg}$. La solución de la muestra, generalmente 5-100 μl , es inyectada dentro de un tubo de grafito de 3-5 cm de longitud, el cual es luego calentado eléctricamente en etapas para producir vapor atómico del análito. En general el programa de calentamiento, comprende una etapa de secado para evaporar el solvente (70-120°C); una etapa de "quemado" (o calcinación) para remover la materia orgánica o los componentes volátiles de la matriz (350-1250°C); una etapa de atomización (2000-3000°C) y, un ciclo de limpieza a temperatura máxima a fin de quemar el análito remanente. Se requiere de una optimización cuidadosa de todos los parámetros del calentamiento durante el desarrollo de un método para obtener resultados reproducibles y exactos (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Al comparar con la FAAS, la atomización electrotérmica padece con mayor frecuencia de interferencias tales como absorción de fondo por especies moleculares o dispersión y efectos de la matriz. Existe una gran importancia en corregir la absorción de fondo por lo cual se dispone de varios y diferentes tipos de sistemas de corrección de fondo (Deuterio, Zeeman y Smith-Hieftje). Las interferencias químicas se encuentran con frecuencia en GFAAS y para muchas aplicaciones se requiere del método de adición de estándar (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Además, algunos elementos (especialmente del grupo periódico V) pueden perderse como compuestos volátiles durante la etapa de calcinación particularmente cuando están presentes haluros. Estos problemas pueden eliminarse usando el procedimiento denominado de la modificación de la matriz. La modificación de la matriz consiste en agregar un material específico que reduce la volatilidad del análito y por lo tanto, permite la calcinación de la muestra a una mayor temperatura (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*). El modificador puede contribuir a hacer que un componente interferente de la matriz sea más volátil sin la pérdida del análito (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Existen muchos fabricantes que ofrecen instrumentos GFAAS para el análisis directo de muestras sólidas tales como polvos, hojuelas, tejidos, etc. La cantidad de muestras tomadas para el análisis fluctúa de 0,1 a 10 mg para concentraciones de análitos en el rango de ppm y las ppb. El muestreo directo de sólidos es útil para aumentar el poder de detección y evitar la disolución de la muestra, la cual ocupa mucho tiempo y aumenta el riesgo de contaminación (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

El muestreo de sólidos también tiene algunas desventajas. Por lo general, la concentración de la matriz es alta debido a que la matriz orgánica no es removida por una etapa de mineralización lo cual da como resultado una alta absorción de fondo y fuertes interferencias químicas. Adicionalmente, el analista generalmente debe asegurarse que la muestra sea homogénea en una escala de unos pocos miligramos. La GFAAS tiene una sensibilidad que es superior aproximadamente un factor de 1000, a la FAAS pero su rendimiento de muestras es mucho menor. Esto puede llegar a convertirse

en una importante desventaja principalmente cuando tiene que determinarse un gran número de elementos en forma rutinaria (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

1.6.3. Interferencias en Espectrofotometría de Absorción Atómica

De manera general en los métodos de absorción atómica se presentan dos tipos de interferencias. Las interferencias espectrales se producen cuando la absorción o emisión de una especie se solapa o aparece muy próxima a la absorción o emisión del analito, de modo que la resolución por el monocromador resulta imposible. Las interferencias químicas se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito. Pueden subdividirse en interferencia por el blanco o aditiva e interferencia por la matriz o multiplicativa (*Skoog 2001*). Una interferencia aditiva puede ser causada por los componentes de la matriz que producen una señal no compensada independiente de la concentración de analitos. Un ejemplo típico es la interferencia espectral producida por H_2SO_4 en la longitud de onda del Fe (248,3 nm) en espectrometría de absorción atómica de llama. Si no puede evitarse el uso de H_2SO_4 para un análisis en particular tal interferencia puede corregirse usando un sistema de corrección del fondo (background) o restando a la señal de la muestra, la señal de un blanco que contiene exactamente la misma cantidad de H_2SO_4 que la muestra (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

Las interferencias multiplicativas o de la matriz son causadas por componentes de la matriz que alteran la respuesta de la señal del componente analito en una forma proporcional a la señal (por ejemplo cambio en la pendiente de la línea de calibración). La separación del elemento a analizar de los elementos de la matriz es una forma eficiente de evitar tales problemas pero por lo general, abarca mucho tiempo y es relativamente costosa. Por lo tanto, se escogen otros enfoques para minimizar las interferencias de la matriz tales como el método del estándar interno, la compatibilización de matrices o el método de adición de estándar (*Skoog 2001*).

En el método del estándar interno, una concentración conocida de un elemento de referencia x_r se agrega a todas las muestras, estándares y blancos. La señal del analito y_i es comparada con la señal del estándar interno y_r . La curva de calibración se prepara graficando la relación entre la señal del analito y la señal de referencia y_i/y_r contra la concentración del analito de los estándares x_i . Las especies de referencia, por lo general son escogidas, por tener propiedades químicas y espectroscópicas similares a aquellas del analito de tal modo que la señal analítica del analito y del estándar interno cambien proporcionalmente cuando ocurren los efectos de la matriz (*Kastenmayer 1995; Skoog 2001*).

En el método de la compatibilización de la matriz, los estándares se preparan para que calcen lo más posible con la matriz de la muestra en que ha de determinarse el analito. Este método se utiliza principalmente para muestras con una matriz simple. Para matrices complicadas o desconocidas, se aplica generalmente el método de adiciones de

estándares. Se toman volúmenes iguales de solución de la muestra; se agregan cantidades conocidas y crecientes del elemento que ha de analizarse a todas las soluciones exceptuando a una. Todas las soluciones son diluidas al mismo volumen y se miden. La adición de estándar puede aplicarse sólo si existe una relación lineal entre la señal y la concentración del análisis *(Kastenmayer 1995)*.

2. Justificación

La contaminación de alimentos por sustancias químicas tales como los metales y los efectos adversos en la salud por exposición a dichas sustancias debe ser evaluada con mayor firmeza en cuanto a seguridad alimentaria nos referimos. Es necesario enfatizar que los riesgos a la salud de la población necesitan ser evaluados de una manera integral, considerando la exposición crónica de metales pesados en alimentos que por lo regular se presenta asintomática durante un tiempo prolongado de vida (*González-Montaña J.R., 2009*).

La presencia de metales pesados en alimentos y particularmente en productos principales de la canasta familiar como lo es la leche, constituye un tema de actualidad debido a la contaminación de la cadena trófica involucrada y a los daños que ocasionan a la salud pública, así como su relevante importancia por ser de fácil acceso en sus múltiples presentaciones y tipos y por ser de alto consumo en toda la población indiscriminadamente de su edad.

A nivel internacional existen diversos estudios que soportan la presencia de contaminantes metálicos en la leche que es consumida por el hombre como ya se mencionó en la introducción de este texto (*Bilandžić N., 2011; González-Montaña J.R. 2009; Järup. L., 2003; Licataa P, 2004; Maas S., 2010; Soares V.A., 2010; Tripathi R.M., 1999*); sin embargo a nivel nacional es poco lo que se ha publicado con respecto a este hecho específico. Aunque carecemos de estos estudios, es conocido el hecho de la presencia de metales en diferentes alimentos como lo demuestra el estudio realizado por Martínez en el año 2010 quien menciona que el cacao en la zona del Cauca - Colombia excede los niveles de Cd establecidos por la OMS (*Martínez R 2010*). De igual manera La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica (*García E.J, Corpoica*). señala que se encuentran niveles tóxicos de Cd y As en los suelos, cultivos y bovinos colombianos, lo que constituye una amenaza para la salud de los animales y hombres que consuman estos alimentos contaminados así como los que se deriven de estos suelos, de igual manera menciona que los niveles de Pb no son tóxicos en la mayoría de los suelos y cultivos pero es urgente frenar el creciente proceso debido a su alta toxicidad. Por otro lado diferentes estudios soportan la presencia de metales pesados (principalmente Cd, Pb y Hg) en los suelos y aguas de las zonas aledañas al río Bogotá ((*Lora 2010; Miranda 2008; Soto 2010*) tanto en la cuenca alta, media y baja; zonas de alta importancia en la industria lechera ya que muchos bovinos se alimentan y son criados en estas zonas pudiendo allegar estos contaminantes a estos animales y los productos que de estos se deriven.

Por ello es importante realizar un muestreo adecuado que nos permita evidenciar los niveles de determinados tóxicos presentes en los alimentos consumidos en la dieta de la

población colombiana mediante una metodología clara, precisa y confiable. Es oportuno poder llegar a ampliar de una manera coherente el sistema de vigilancia y completar este tipo de análisis realizando seguimiento a la inocuidad de la misma, determinando los niveles de metales (en este caso Cd y Pb) que pueda llegar a contener la leche. Bien es sabido que la leche es un componente esencial de la dieta posterior de los lactantes, la calidad de ella influye en la continuidad de la salud de los niños y los adolescentes; esta contiene más de 300 constituyentes nutricionales necesarios para el crecimiento y desarrollo del neonato e infante como son lípidos, proteínas, vitaminas y minerales; también posee metales esenciales en nuestra dieta como pueden ser el Fe, Co, Cu, Mn, Mo y Zn; sin embargo, existen otros metales que no cumplen función biológica alguna conocida y es mejor evitarlos siempre, tal es el caso del Hg, Pb, Cd entre otros (*Pereira J.S.F.; Acosta N.M. 2011*).

Con la determinación de los niveles de Pb y Cd durante un tiempo determinado y específico en la leche procesada proveniente del plan de muestreo que se llevará a cabo en los puntos de venta de leche procesada nos permitirá primero evaluar si es o no pertinente llevar de manera rutinaria este tipo de análisis para sugerir como plan de investigación y vigilancia a los entes reguladores y segundo en caso de encontrar niveles considerables de estos metales que puedan poner en riesgo la población consumidora poder generar alertas tempranas, pautas, estrategias de prevención que junto con estudios más robustos, extensos y amplios permitan a futuro llenar vacíos normativos y/o regulatorios.

Cabe resaltar que el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina cuenta con la infraestructura y la tecnología adecuada para el desarrollo de una técnica analítica que permite cuantificar la presencia de metales en diferentes tipos de matrices. Cuenta con un equipo de Absorción Atómica con horno de grafito y generador de hidruros y la infraestructura adecuada cumpliendo los estándares de calidad exigidos por la norma ISO/NTC/IEC 17025: 2005 en aras de una futura acreditación del Laboratorio. Por otro lado, el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina contará con una metodología validada para la determinación de Cd y Pb en un alimento de alto consumo e impacto y será pionera en este análisis que a nivel local (Bogotá D.C.) no ha sido realizado con un enfoque de riesgo toxicológico alimentario.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existen niveles de Cd y Pb en la leche comercializada a nivel Bogotá D.C.?

3.Objetivos

3.1. *Objetivo general*

Determinar los niveles de Pb y Cd en la leche comercializada (procesada y/o cruda) en la ciudad de Bogotá durante de un periodo fijo de un mes.

3.2. *Objetivos específicos*

- ✚ Validar una metodología analítica para la cuantificación de Pb y Cd en leche procesada (liquida) por Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito.
- ✚ Cuantificar los niveles de Pb y Cd en las muestras provenientes del muestreo en el periodo establecido.
- ✚ Analizar las implicaciones toxicológicas de los niveles de Pb y Cd encontrados.

4. Metodología

4.1. Toma de muestra – Plan de Muestreo

Se llevó a cabo un estudio de tipo transversal con las muestras adquiridas por los centros donde se comercializa leche procesada durante un periodo de fijo y continuo de tiempo.

Las variables para el diseño del plan de muestreo: Este muestreo se realiza en leche comercializada (procesada) líquida.

Muestras tomadas en centros de ventas en la ciudad de Bogotá D.C.

Periodo fijo de un mes consecutivo.

Criterio de Inclusión: Leche comercializada en la ciudad de Bogotá D.C.

Criterio de Exclusión: Leche no comercializada en la ciudad de Bogotá D.C.

El plan de muestreo fue diseñado para garantizar en una medida importante la trazabilidad del producto analizado.

Universo poblacional y marco muestral: Leche procesada-comercializada líquida de las marcas y productoras comercializadas en la ciudad de Bogotá D.C.

En la siguiente tabla se referencia las productoras y marcas de leche que se comercializan en la ciudad de Bogotá. Las cuales son el universo poblacional de este estudio.

PRODUCTOR	MARCA	CLASE DE LECHE		
		Pasteurizada	UAT /UHT	Deslactosada
Alagarra SA	Olimpica		x	X
Alagarra SA	Carulla		X	X
Alagarra SA	De La Finca		X	X
Alagarra SA	Alagarra			X
Alagarra SA	JBO		X	
Alimentos de Madrid SAS	Esmeralda			X
Alimentos de Madrid SAS	Tradicional	X		
Alimentos de Madrid SAS	La ramada	X		
Alimentos de Madrid SAS	Brama	X		
Alimentos de Madrid SAS	Hato Grande	X		
Alimentos de Madrid SAS	Supercundi		X	
Alimentos del Valle SA	San		X	X

	Fernando			
Alimentos El Jardín SA	El Jardín		X	X
Alimentos LecheBoy SAS	Paquita		X	X
Alimentos LecheBoy SAS	LecheBoy		X	X
Alimentos Monte Carlo	Colandes	X		
Alimentos Monte Carlo	Montelac	X		
Alimentos Monte Carlo	Colandes	X		
Alimentos Pippo SA	Colfrance		X	X
ALIVAL SA	San Fernando		X	
Almacol SAS	La Tradicional	X		
Alpina Productos Alimenticios SA	Alpina		X	X
Bonest	Los Rosales	X		
Bonest	Bonest	X		
Ceuco de Colombia Ltda	Coguita	X		
Ceuco de Colombia Ltda	Ceuco	X		
Colanta Ltda	Montefrío			
Colanta Ltda	Colanta	X	X	X
Comercializadora JMP	La Nueva Leche	X		
Comercializadora JMP	La Cantina	X		
Comercializadora JMP	La Granja	X		
Comlemo Ltda	La Gran Vía	X	X	X
Cooperativa de Productos lácteos de Nariño Ltda.	Colacteos		X	X
Doña Leche Alimentos SA	Doña Leche		X	
El Pomar SA	YEP		X	X
El Pomar SA	El Pomar		X	X
El Pomar SA	Levelma		X	X
Hacienda San Mateo	San Mateo		X	X
Incolacteos Ltda	Lacteos Superior		X	X
Incolacteos Ltda	Lechesan		X	X
La Pradera SAS	La Pradera	X		
La Pradera SAS	Prado Grande	X		
La Pradera SAS	La Vaquita	X		
Lácteos La Arboleda	Latti			X
Lácteos La Arboleda	Adilac		X	X
Lácteos La Arboleda	La Arboleda	X	X	X
Lacteos Villa Aura S en CS	Portalac	X	X	X

Ledesa SA	La Granjera	X		X
Parmalat Colombia Ltda	Symil			X
Parmalat Colombia Ltda	Parmalat		X	X
Pasteurizadora Santo Domingo	Santo Domingo		X	X
Pasteurizadora Santo Domingo	Nany		X	X
PRIMMA Compañía de Alimentos SAS	Granjera	X		
Procesadora Lacto	Lacto	X		
Prodilacteos Ltda	Alkosto		X	X
Productos Lácteos Colfrance CP S en C	Colfrance	X		
Productos Lácteos El Recreo SA	Latti	X		
Productos Lácteos El Recreo SA	Qualite		X	X
Productos Lácteos El Recreo SA	Surtimax		X	X
Productos Lácteos El Recreo SA	El recreo		X	X
Productos Naturales de la Sabana SA Alqueria	Alquería		X	X
Quich Ptasty	MR. Quich		X	
Tio Campo Ltda	Tio campo		X	X

Tabla No. 5. Productoras y marcas de leche comercializadas en la ciudad de Bogotá D.C.

Las muestras fueron tomadas directamente de los centros de ventas.

El muestreo se realizó de la siguiente manera: Muestras recolectadas semanalmente entre 12 a 15 muestras de leche procesada líquida comercializada. Con un total de 48 a 60 muestras de leche líquida mensual. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Tipo de muestreo: Muestreo consecutivo – Doble ciego. Estudio de corte transversal. Las muestras fueron tomadas en los centros de ventas en Bogotá; el investigador no conoció la marca o procesadora de la leche en estudio en el momento de realizar el análisis con el ánimo de no sesgar el estudio. Las muestras fueron entregadas al investigador en tubos falcón de 50 mL numeradas consecutivamente; las cuales fueron procesadas y analizadas por duplicado.

Cobertura: El muestreo represento entre un 80 al 100% de las empresas productoras y de las marcas de leche procesada líquida que se comercializa en la ciudad de Bogotá D.C. El estudio cubrió la cantidad mayor de muestras asequibles durante este estudio en ese periodo de tiempo independientemente del tipo de leche que se muestreo por marca o por procesadora.

Unidad de observación estadística: Se realizó el muestreo en los puntos de venta de leche procesada. La cantidad de muestra a tomar equivalió al mínimo de muestra más el

20 % necesaria para realizar el análisis por duplicado, teniendo en cuenta muestras por fortificar y una contramuestra. Una cantidad mínima de 15 mL por duplicado

Período de referencia: El muestreo se llevó a cabo entre un periodo fijo que fue aproximadamente de un mes consecutivo.

4.2. Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- ✚ Espectrofotómetro de Absorción Atómica Thermo iCE 3400 AA con Horno Grafito GF95 y sistema de refrigeración, automuestreador para el horno de grafito FS95, lámpara de Deuterio, lámpara de cátodo hueco de Cd, lámpara de cátodo hueco de Pb y cubetas (tubos) de grafito recubiertas pirolíticamente o de larga vida.
- ✚ Balanza analítica de precisión (División de escala 0,0001 g)
- ✚ Horno microondas marca CEM modelo MARS-5*
- ✚ Nevera para reactivos.
- ✚ Congelador para muestras
- ✚ Cabina de extracción

* No pertenece al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Materiales

- ✚ Tubos de polipropileno de fondo cónico, graduados, de 50 mL con tapa rosca.
- ✚ Pipetas volumétricas de vidrio borosilicato de 5 y 10 mL, clase A.
- ✚ Probetas de 100 y 1000 mL.
- ✚ Vasos de precipitados de 2 L.
- ✚ Balones volumétricos de 10 y 50 mL de capacidad. Clase A.
- ✚ Micro pipetas automáticas de volumen ajustable de: 10 - 100 μ L y de 100-1000 μ L
- ✚ Argón grado 4.8 para espectrofotometría de absorción atómica.

Matriz empleada en la validación

Leche UHT Entera. El blanco de matriz fue analizado previamente por ICP-MS.

Reactivos, soluciones, estándares de referencia

- ✚ Agua tipo I tipo I. (resistividad específica > 18.2 MOhm/cm a 25 °C).

- ✚ Ácido nítrico 65 - 70 % p/v para análisis de trazas de metales J.T. Baker o equivalente. Suprapur
- ✚ Solución patrón: a partir de la solución estándar certificada para cadmio
- ✚ Solución patrón: a partir de la solución estándar certificada para plomo
- ✚ Solución patrón: a partir de la solución estándar certificada para estaño
- ✚ Solución de Nitrato de magnesio 1:5
- ✚ Solución de Nitrato de paladio 1:5
- ✚ Metanol Grado Reactivo
- ✚ Tritón X100

Sustancia	Proveedor	Concentración	Lote	Fecha de vencimiento
Estándar de Referencia Cadmio	Accu Trace	10000 µg/L	211125109	Dic - 2016
Estándar de Referencia Plomo	Accu Trace	10000 µg/L	213045020	Abril - 2018
Estándar de Referencia Estaño	Accu Trace	10001 µg/L	212055069	Mayo - 2017
MOD – 09C-1 Modificador de matriz Nitrato de Paladio	AccuStandard	1 % Nitrato de paladio. 2 – 5 % Ácido Nítrico	21215048	Dic - 2017
MOD-07-1 Modificador de matriz Nitrato de Magnesio	AccuStandard	2 % Nitrato de Magnesio. 2 – 5 % Ácido Nítrico	212025168	Marzo - 2017

Tabla No. 6. Estándares certificados y modificadores utilizados

Preparación de las soluciones estándar:

Solución estándar de 100 ppm de Cadmio:

A partir de la solución de 10000 ppm de estándar certificado de cadmio; pipetear 0,1 mL de la solución patrón en un balón volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Solución estándar de 1 ppm de Cadmio:

A partir de la solución de 100 ppm; pipetear 0,1 mL de la solución en un balón volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Solución estándar de 100 ppb de Cadmio:

A partir de la solución de 1 ppm (1000 ppb); pipetear 1 mL de la solución en un balón volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Solución estándar de 5 ppb de Cadmio:

A partir de la solución de 100 ppb; pipetear 0,5 mL de la solución patrón en un balón volumétrico de 10 mL. Adicionar 1 mL de HNO₃ 70% Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Soluciones estándar de calibración:

De la solución de 1000 ppb µg/mL tomar alícuotas de 10, 25, 40, 75, 100 y 125 µL en cinco balones volumétricos de 50 mL, adicionar luego 5 mL de HNO₃ 70% y completar a volumen con agua tipo I, obteniendo así soluciones estándar de 0,2; 0,5; 0,8; 1,5, 2.0 y 2,5 ppb de Cd (2,5 µg Cd/L) respectivamente. Preparar un blanco de reactivos en las mismas condiciones.

Solución estándar de 100 ppm de Plomo:

A partir de la solución de 10000 ppm de estándar certificado de plomo; pipetear 0,1 mL de la solución patrón en un balón volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Solución estándar de 1 ppm de Plomo:

A partir de la solución de 100 ppm; pipetear 0,1 mL de la solución en un balón volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Solución estándar de 100 ppb de Plomo:

A partir de la solución de 1 ppm (1000 ppb); pipetear 1 mL de la solución en un balón volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Solución estándar de 30 ppb de Plomo:

A partir de la solución de 1000 ppb de Plomo; pipetear 0,3 mL de la solución patrón en un balón volumétrico de 10 mL. Adicionar 1 mL de HNO₃ 70% Diluir a volumen con agua tipo I y mezclar bien.

Soluciones estándar de calibración:

De la solución de 1000 ppb µg/mL tomar alícuotas de 10, 25, 40, 75, 100 y 125 µL en cinco balones volumétricos de 50 mL, adicionar luego 5 mL de HNO₃ 70% y completar a volumen con agua tipo I, obteniendo así soluciones estándar de 0,2; 0,5; 0,8; 1,5, 2.0 y 2,5 ppb de Cd (2,5 µg Cd/L) respectivamente. Preparar un blanco de reactivos en las mismas condiciones.

Solución de lavado:

La solución de lavado para el equipo, tiene una proporción de Metanol al 10 %, HNO₃ al 5 % y Tritón 0,1% v/v.

4.3. Procedimiento para la determinación de Cd en leche

El Cd es determinado en la solución de la muestra mediante Espectrofotometría Absorción Atómica por Horno de Grafito. Se emplea una lámpara de Cátodo Hueco de Cd como fuente y una lámpara de Deuterio como corrector de fondo.

Pesar aproximadamente 1,0 g de muestra (leche líquida) por duplicado. En tubos de polipropileno de fondo cónico de 50 mL de capacidad con tapa rosca resistente a 110°C.

Bajo campana de extracción de gases adicionar lentamente 5 mL de HNO₃ del (65 - 70%) (para análisis de trazas) y ajustar la tapa herméticamente. Preparar simultáneamente un blanco de reactivos.

Realizar digestión en el equipo de microondas: Digestión en sistema cerrado.

- ✚ Seleccionar el método en el sistema de horno microondas Marca CEM Modelo MARS-5 de acuerdo a la programación establecida previamente. En este caso el Método es denominado: T Animal 30 Tubos; la programación establecida:

STAGE	POWER		RAMP	°C	HOLD
	MAX	%		CONTROL	
1	1600W	80	10:00	210	15:00

Tabla No. 7. Programa para la digestión de muestras de leche en microondas

- ✚ De acuerdo al número de muestras seleccionar el programa de digestión.
- ✚ Correr un blanco de reactivos y muestras fortificadas por cada serie de digestión.
- ✚ Digerir la muestra en el microondas hasta la aparición de color traslucido.
- ✚ Dejar enfriar por 30 minutos como mínimo.

Una vez digerida la muestra transferir cuantitativamente el contenido a un balón de 50 mL; mediante enjuagues sucesivos con agua tipo I completar a volumen con agua tipo I. Tapar cuidadosamente y homogenizar.

La muestra se puede guardar a temperatura ambiente sino se a analizar inmediatamente en el término de una semana o si el análisis no va a ser dentro de la semana siguiente se puede guardar en la nevera por aproximadamente dos meses.

Utilizando una micropipeta, dispensar 1,5 mL de cada una de las soluciones de calibración y de las muestras en las copas del automuestreador del horno de grafito.

Preparar una solución del modificador de matriz de nitrato de paladio de manera que el equipo con una cantidad de 10 µg en 5 µL. Realizar una dilución de 1:2

Ubicar cada en cada uno de las copas del automuestreador del horno de grafito, de acuerdo al método seleccionado (*Cadmio en Leche 2014*); el blanco, el diluyente, el modificador de matriz, estándar maestro.

Determinación del contenido de Cd.

Seleccionar el método para la determinación de Cd, Cadmio en Leche 2014. Programar las muestras a analizar y poner el equipo a punto de acuerdo con las instrucciones del fabricante y buenas prácticas de laboratorio.

Parámetro	Valor
<i>Fuente</i>	Lámpara de cátodo hueco de Cd
<i>Corriente de la lámpara</i>	Uso normal: 75 %
<i>Mejor sensibilidad</i>	50%
<i>Mejor precisión</i>	100%
<i>Longitud de onda</i>	228.8 nm
<i>Ancho de rendija</i>	0,5 nm
<i>Corrector de fondo</i>	D2
<i>Gas de purga</i>	Argón
<i>Presión de Argón</i>	17 psi
<i>Volumen de inyección</i>	20 µL
<i>Volumen alterno</i>	5 µL de nitrato de magnesio al 1%
<i>Señal</i>	Señal 20 µL de 0,8 ug/L absorben aproximadamente 0.1 A.

Tabla No. 8. Parámetros de operación del equipo para la determinación de Cd

Fase	Temp	Tiempo	Rampa	Gas	Gas
	(°C)	(s)	(°C/s)	Tipo	Flujo
1	100	30	10	2	0,2L/min
2	600	20	150	2	0,2L/min
3	1000	3	0	2	Apagado
4	2500	3	0	2	0,2L/min

Tabla No. 9. Programa del horno de grafito para la determinación de Cd

Calibración y lectura de la muestra

Se corre un blanco de reactivos para ajustar el cero; se calibra con las soluciones estándar y la concentración de las muestras se establece mediante interpolación automática en µg/L. La calibración y la lectura de la muestra se realiza siguiendo el Anexo II. Guía operativa del espectrofotómetro de absorción Atómica Thermo Elemental Solaar iCE 3400”.

Cálculos

El contenido de Cd en la muestra se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de Cd } (\mu\text{g/kg}) = (\text{Lec.} \times 0,050)/P$$

Lec. = Lectura del equipo en $\mu\text{g/L}$ de Cd; P = Peso de la muestra en g

Verificación

Revisión de la calidad de los reactivos. Preparar y correr un blanco de reactivos siguiendo el método completo. Si la señal emitida por el blanco no sobrepasa el límite de detección, se descarta que tanto los reactivos y materiales utilizados están afectando los niveles de respuesta para las muestras y estándares.

La curva de calibración es ajustada automáticamente por el software del equipo mediante el método de mínimos cuadrados. Se examina si los parámetros de la curva de calibración se mantienen dentro de los límites de confianza establecidos para el método. Se acepta como mínimo un coeficiente de correlación (r) de 0,99. Se analizan un estándar de concentración conocida como Control de Calidad (QC) y un blanco de reactivos mínimo cada 10 muestras dentro de una corrida analítica para verificar que no se produzcan cambios significativos en la línea base. Cada muestra es procesada y analizada por duplicado y el valor obtenido para cada duplicado es el resultado de dos lecturas consecutivas sobre el mismo (2 remuestras). Los porcentajes de recuperación deben estar entre 80-110%.

4.4. Procedimiento para la determinación de Pb en leche

El Pb es determinado en la solución de la muestra mediante Espectrofotometría Absorción Atómica por Horno de Grafito. Se emplea una lámpara de Cátodo Hueco de Pb como fuente y una lámpara de Deuterio como corrector de fondo.

Pesar aproximadamente 1,0 g de muestra (leche líquida) por duplicado. En tubos de polipropileno de fondo cónico de 50 mL de capacidad con tapa rosca resistente a 110°C.

Bajo campana de extracción de gases adicionar lentamente 5 mL de HNO_3 del (65 - 70%) (para análisis de trazas) y ajustar la tapa herméticamente. Preparar simultáneamente un blanco de reactivos.

Realizar digestión en el equipo de microondas: Digestión en sistema cerrado.

- ✚ Seleccionar el método en el sistema de horno microondas Marca CEM Modelo MARS-5 de acuerdo a la programación establecida previamente. En este caso el Método es denominado: T Animal 30 Tubos; la programación establecida:

STAGE	POWER		RAMP	°C	HOLD
	MAX	%		CONTROL	
1	1600W	80	10:00	210	15:00

Tabla No. 10. Programa para la digestión de muestras de leche

- ✚ De acuerdo al número de muestras seleccionar el programa de digestión.
- ✚ Correr un blanco de reactivos y muestras fortificadas por cada serie de digestión.
- ✚ Digerir la muestra en el microondas hasta la aparición de color traslucido.
- ✚ Dejar enfriar por 30 minutos como mínimo.

Una vez digerida la muestra transferir cuantitativamente el contenido a un balón de 50 mL; mediante enjuagues sucesivos con agua tipo I completar a volumen con agua tipo I. Tapar cuidadosamente y homogenizar.

La muestra se puede guardar a temperatura ambiente sino se a analizar inmediatamente en el término de una semana o si el análisis no va a ser dentro de la semana siguiente se puede guardar en la nevera por aproximadamente dos meses.

Utilizando una micropipeta, dispensar 1,5 mL de cada una de las soluciones de calibración y de las muestras en las copas del automuestreador del horno de grafito.

Preparar una solución del modificador de matriz de nitrato de magnesio de manera que el equipo con una cantidad de 50 µg en 5 µL. Realizar una dilución de 1:5

Ubicar cada en cada uno de las copas del automuestreador del horno de grafito, de acuerdo al método seleccionado (*Plomo en Leche 2014*); el blanco, el diluyente, el modificador de matriz, estándar maestro.

Determinación del contenido de Pb.

Seleccionar el método para la determinación de Pb, Plomo en Leche 2014. Programar las muestras a analizar y poner el equipo a punto de acuerdo con las instrucciones del fabricante y buenas prácticas de laboratorio.

Parámetro	Valor
<i>Fuente</i>	Lámpara de cátodo hueco de Pb
<i>Corriente de la lámpara</i>	Uso normal: 75 %
<i>Mejor sensibilidad</i>	50%
<i>Mejor precisión</i>	100%
<i>Longitud de onda</i>	283.3 nm
<i>Ancho de rendija</i>	0,5 nm
<i>Corrector de fondo</i>	D2
<i>Gas de purga</i>	Argón
<i>Presión de Argón</i>	17 psi
<i>Volumen de inyección</i>	20 µL
<i>Volumen alterno</i>	5 µL de nitrato de magnesio al 1%
<i>Señal</i>	Señal 20 µL de 2,5 µg/L absorben aproximadamente 0.1 A.

Tabla No. 11. Parámetros de operación del equipo para la determinación de Pb

<i>Fase</i>	<i>Temp</i> (°C)	<i>Tiempo</i> (s)	<i>Rampa</i> (°C/s)	<i>Gas</i> Tipo	<i>Gas</i> Flujo
1	100	30	10	2	0,2L/min
2	800	20	150	2	0,2L/min
3	1200	3	0	2	Apagado
4	2500	3	0	2	0,2L/min

Tabla No. 12. Programa del horno de grafito para la determinación de Pb

Calibración y lectura de la muestra

Se corre un blanco de reactivos para ajustar el cero; se calibra con las soluciones estándar y la concentración de las muestras se establece mediante interpolación automática en µg/L. La calibración y la lectura de las muestra se realiza siguiendo el Anexo II. Guía operativa del espectrofotómetro de absorción Atómica Thermo Elemental Solaar iCE 3400

Cálculos

El contenido de Pb en la muestra se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de Pb } (\mu\text{g/kg}) = (\text{Lec.} \times 0,050) / P$$

Lec. = Lectura del equipo en µg/L de Pb

P = Peso de la muestra en g

A continuación se representa el diagrama general para la determinación de plomo y cadmio que se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

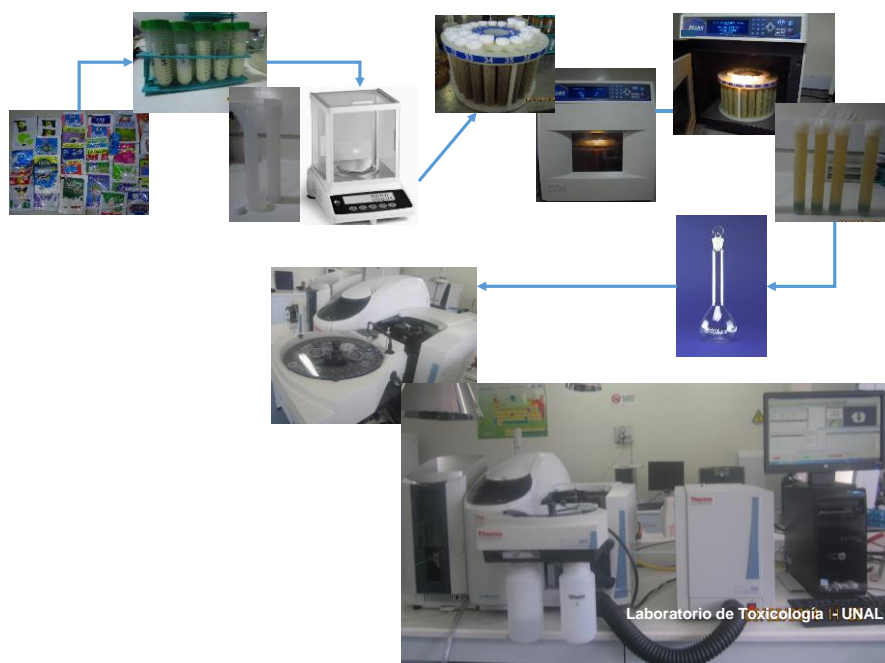


Figura No. 6. Procedimiento para la determinación de cadmio y plomo en muestras de leche por Espectrofotometría de Absorción Atómica

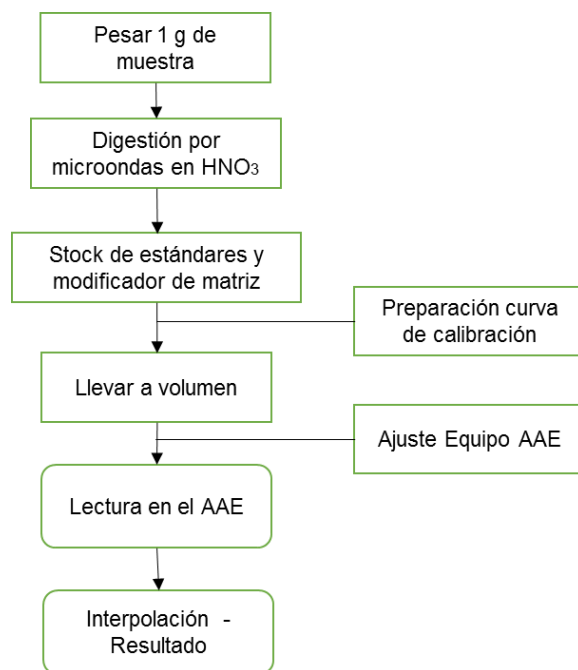


Figura No. 7. Diagrama General para la determinación de cadmio y plomo en muestras de leche por Absorción Atómica

4.5. Condiciones óptimas para la determinación los análisis de interés

Como condiciones previas al análisis de metales en cualquier matriz se debe tener en cuenta que el material de vidrio, polipropileno y porcelana debe estar libre de cualquier posible contaminación con metales; por ello se debe seguir el siguiente procedimiento para el lavado:

1. Dejar durante mínimo 3 horas, en agua: dextrano.
2. Dejar durante mínimo 3 horas, en una solución de agua: HNO₃ 25%.
3. Enjuagar con agua:dextrano
4. Enjuagar con agua: jabón convencional del material de lavado del laboratorio
5. Enjuagar con suficiente agua

Conservar siempre las normas de seguridad y las buenas prácticas de laboratorio.

Se requiere que los reactivos empleados sean de alta pureza (reactivos para absorción atómica), con niveles mínimos de trazas de metales.

Dentro de las condiciones ambientales el análisis por absorción atómica se efectúa a una temperatura ambiente que oscila entre 10 y 35 °C y una humedad relativa de 40 – 80 %. Se requiere un suministro eléctrico de 110 y 220 voltios.

Las condiciones óptimas para la determinación de los análisis de interés en el equipo son previamente realizadas antes de iniciar el procedimiento de análisis. Para ello se seleccionan un rango de temperaturas para la fase de calcinación y la fase de atomización en el programa del horno. En el software se debe seleccionar el ítem *Acción*; posteriormente seleccionar la opción *Calc – Atomiz*. Previamente seleccionar el rango de temperaturas en el cual se realizara la optimización. El equipo realizara la acción combinando temperaturas de calcinación y temperaturas de atomización. El analista selecciona las condiciones óptimas para estas dos temperaturas de acuerdo a la señal obtenida. La señal debe ser simétrica similar a una curva gaussiana. Ver Anexo I.

4.6. Validación del método analítico

El método para la determinación de Cd y Pb en leche líquida procesada comercializada desarrollado en el presente trabajo es una adaptación de los métodos oficiales (AOAC Official Method 999.10, 2010 Jorhem L., Engman J. 2000, AOAC Official Method 973.35, 2010, Kazi T.G., Jalbani N., Baig J.A., et. al. 2009; UNE-EN-14084: 2003).

La metodología analítica se desarrolló y validó de acuerdo a los parámetros recomendados por la Guía Eurachem (*Eurachem Guide, 2014*) y las consideraciones de los nuevos métodos analíticos para ser usados en el análisis de alimentos; así como los parámetros establecidos en los métodos oficiales (AOAC Official Method 999.10, 2010 Jorhem L., Engman J. 2000, AOAC Official Method 973.35, 2010, UNE-EN-14084: 2003).

Como se trata de una modificación de un método normalizado, el objetivo es la comprobación de que la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia y la exactitud del método original no dependen de la modificación introducida y que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente. Los parámetros estadísticos analizados fueron: selectividad, modelo de calibración (linealidad), exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límite de cuantificación (LC), límite de detección (LD), exactitud como % recuperación. Estos parámetros de validación se evaluaron en la metodología analítica para la determinación y cuantificación de Cd y Pb en muestras de leche líquida procesada.

Cuando los análisis se trabajan en agua y no son sometidos a ningún procedimiento de preparación de muestra se denomina el Sistema. Cuando la matriz leche se fortifica con los análisis y son sometidos al procedimiento de análisis de muestra se denomina el Método.

De acuerdo a la ISO 9000: 2005 una validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

La Guía Eurachem define a una validación como el proceso para establecer las características de rendimiento y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar estas características y en qué medida (*Eurachem Guide, 2014*).

Selectividad

Es la capacidad de un método para determinar con precisión y específicamente el análisis de interés en la presencia de otros componentes en una matriz de la muestra. La selectividad del método fue evaluada de dos maneras.

Con Interferencias conocidas similares al análisis: Se verificó con matriz blanco, matriz adicionada con sustancias de naturaleza similar al análisis estudiado que puedan encontrarse en la matriz. Se realizó el análisis por triplicado comparando matriz blanco, matriz fortificada con análisis y matriz fortificada con análisis adicionada con interferentes.

Linealidad - Rango del sistema

Se define como la capacidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración de análisis (*Eurachem Guide, 2014*). Para determinar la linealidad y sensibilidad del sistema se emplearon soluciones de los estándares que cubran el intervalo de trabajo. Se trabajó con seis distintas concentraciones, realizando 3 réplicas. Se recomienda que el intervalo escogido cubra el rango de concentración esperada en las muestras problema. Como es el caso del Pb el cual esta normado en Colombia por la Resolución 4506 de 2013, con un LMR de 0,02 mg/kg. Antes de la preparación de los patrones se debe efectuar el control de pureza de los solventes correspondientes, cuando se considere necesario.

Para ambos metales estudiados (Cd y Pb) se trabajó con concentraciones de 0,2; 0,5; 0,8; 1,5; 2,0 y 2,5 ug/L (ppb).

Linealidad del método

Se prepararon muestras de matriz blanco enriquecidas con concentraciones iguales a la curva de calibración del sistema, se realizan de 3 para cada nivel de concentración.

Límite de detección y de cuantificación del sistema

Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

Se realizó la medición a un número mínimo de 10 blancos, y se calculó la desviación estándar de la respuesta.

$$LD = 3 \times (s/b)$$

$$LC = 10 \times (s/b)$$

En donde s es la desviación estándar y b la pendiente de la curva de calibración.

Exactitud y precisión intermedia

Es el grado de concordancia entre el resultado y el valor de referencia aceptado (*Eurachem Guide, 2014*). La precisión intermedia expresa la precisión con variaciones internas de los laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. Se realizaron 6 lotes, siendo cada lote totalmente independiente, es decir que las soluciones estándar, preparación de las muestras, etc, fueron preparadas nuevamente en cada lote, el lote contenía: un blanco de reactivos, cada lote se realizó por triplicado, matriz blanco, matriz blanco más adicionado (tres niveles de adición que se encuentren dentro del rango lineal establecido de concentración). En nuestro caso particular para tener condiciones de precisión intermedia se trabajó con lotes independientes en diferentes días. La evaluación de la exactitud fue realizada como porcentaje de recuperación siguiendo los lineamientos de la Guía Eurachem (*Eurachem Guide, 2014*)

Repetibilidad del sistema y del método:

Para evaluar la dispersión del sistema en condiciones de repetibilidad se realizó diez determinaciones del estándar en tres niveles de concentración que se encuentren dentro del rango lineal establecido de concentración del análisis.

Para evaluar la dispersión del método en condiciones de repetibilidad se realizó diez determinaciones del estándar en tres niveles de concentración que se encuentren dentro del rango lineal establecido de concentración del análisis en matriz fortificada.

PARAMETRO	No DE MUESTRAS	ESTADISTICOS	CRITERIOS DE ACEPTACION
<i>Selectividad</i>	Matriz blanco, matriz adicionada con sustancias de naturaleza similar al análisis estudiado (metales). 3 réplicas para cada grupo	Comparando matriz blanco, matriz fortificada con análisis y matriz fortificada con análisis adicionada con interferentes. t student	La cuantificación no se debe ver afectada por la presencia de interferentes. CV Horwitz
<i>Linealidad del sistema</i>	6 concentraciones 3 replicas	Coefficiente de correlación (r), Test de Hipótesis: pendiente, intercepto, ANOVA	$R^2 \geq 0.99$, test de Fisher
<i>Linealidad del método</i>	6 concentraciones 3 replicas	Coefficiente de correlación (r), Test de Hipótesis: pendiente, intercepto, ANOVA	$R^2 \geq 0.99$, test de Fisher

<i>Límite de detección del sistema</i>	Blancos de matriz 10 Replicas, Curva de calibración.	Desviación estándar, pendiente, LDS $= 3^* s/b;$	LD < LC
<i>Límite de detección del método</i>	Blancos de matriz 10 Replicas, Curva de calibración.	Desviación estándar, pendiente, LDS $= 3^* s/b;$	LD < 20% LMR; LD < LC
<i>Límite de Cuantificación del método</i>	Blancos de matriz 10 Replicas, Curva de calibración	Desviación estándar, pendiente, LDS $= 10^* s/b;$	LD < 50% LMR
<i>Exactitud – Precisión Intermedia</i>	6 Lotes conformados por: 1 Blanco, 3 matriz blanco, 3 matriz blanco más adicionado. 3 replicas	% Recuperación - ANOVA	Decisión 657/2002 UE: Si la fracción de Masa es $\leq 1\mu\text{g/Kg}$, la recuperación debe estar entre 50%-120%. – Test de Fisher.
<i>Repetibilidad del método</i>	6-10 Determinaciones del estándar utilizado en los tres niveles de interés.	Coefficiente de Variación	CV de Horwitz.

Tabla No. 13. Parámetros y estadísticos para la validación

4.7. Recopilación de datos

Como se trata de un estudio con muestreo consecutivo doble ciego, las muestras fueron analizadas sin identificar su procedencia (marca y/o productor) en el momento de realizarse la lectura. Posteriormente al análisis su identidad fue realizada. Ver anexo III.

Todos los datos fueron procesados en el momento del análisis por el Espectrofotómetro de Absorción atómica con el SOLAAR AA Software Versión 11.03 de Thermo Scientific.

El análisis y tratamiento de datos para la validación fue realizado con la hoja de cálculo en Excel 2013 de Microsoft Office 2013. Los resultados se expresaran hasta con 4 cifras decimales por tratarse de un análisis de residuos y por iniciar el proceso con una balanza de 4 cifras decimales.

4.8. Consideraciones éticas

El presente estudio se desarrolló conforme a las consideraciones éticas de la resolución 008430 de 1993 del ministerio de salud de la República de Colombia. De acuerdo al riesgo inherente al estudio, se clasifica como investigación sin riesgo según el artículo 11 ítem a), Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de

investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta. Este estudio empleó la Absorción Atómica como técnica analítica para la determinación de niveles de metales (Pb y Cd) en una matriz alimenticia, como lo es la leche, y en ningún momento se intervendrá con seres humanos; ya que estas muestras provienen de diferentes puntos de comercialización de este producto dentro de la ciudad de Bogotá. La aprobación ante comité de ética está registrada en el Acta de Evaluación No.: 023-14 con fecha de 27 de marzo de 2014, conforme se muestra en el Anexo I de este documento.

5.Resultados

5.1. Validación técnica para la determinación de Cd y Pb por espectrofotometría de absorción atómica asistida con horno de grafito

Análito y matriz: Los análisis objeto de este estudio son Cd y Pb y la validación se realizó en matriz leche líquida comercial.

Parámetros a verificar o validar: Se verifico el cumplimiento de los siguientes parámetros estadísticos: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud (%recuperación), precisión intermedia, repetibilidad, especificidad o selectividad.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se realizó a partir de un estándar certificado de cadmio de 10.000 ppm (Lote 211125109), cada punto se analizó por triplicado con el fin de verificar la repetibilidad de cada dato.

Se prepararon seis soluciones de Cd (0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,5 ppb) en HNO₃ al 10% para realizar la calibración del equipo.

5.1.1.Linealidad del sistema para Cadmio

Para determinar la linealidad y sensibilidad del sistema se prepararon soluciones de diferentes concentraciones entre 0,2 y 2,5 ppb cubriendo el intervalo de trabajo. Se realizaron tres replicas.

CURVAS DEL SISTEMA Cd				
ID MUESTRA	CONC. (µg/L)	SEÑAL (Abs)		
		Lote I	Lote II	Lote III
Blanco	0,00	0,0021	0,0011	0,0067
Estándar 1	0,25	0,0281	0,0387	0,0310
Estándar 2	0,50	0,0584	0,0634	0,0518
Estándar 3	0,80	0,1024	0,1010	0,0976
Estándar 4	1,50	0,1949	0,2066	0,1965
Estándar 5	2,00	0,2730	0,2878	0,2707
Estándar 6	2,50	0,3535	0,3338	0,3292

Tabla No. 14. Curvas Linealidad Sistema Cd

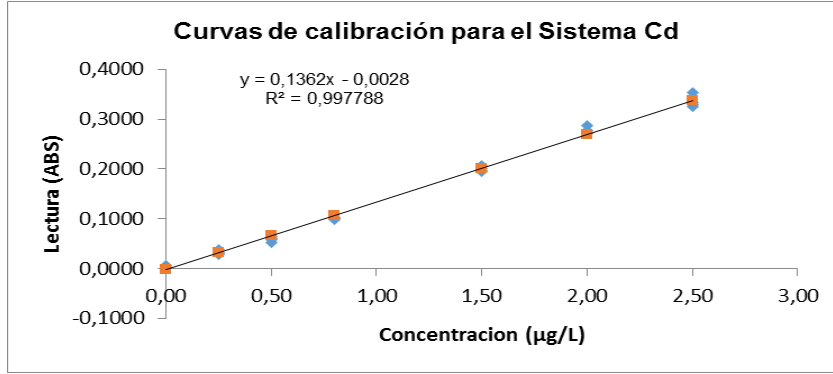


Figura No. 8. Grafico de linealidad sistema Cd

Gráfico de residuales del sistema para Cadmio

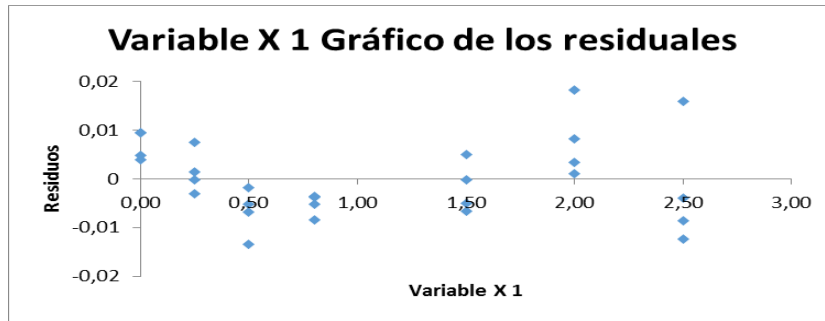


Figura No. 9. Grafico de residuales sistema Cd

Análisis de varianza del sistema

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,394018813	0,394018813	6135,15333	2,09015E-32
Residuos	26	0,001669802	6,42231E-05		
Total	27	0,395688615			

Tabla No. 15. Análisis de varianza del sistema para Cd

Límites de confianza del sistema

	Coeficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,002816869	-0,007772214	0,002138476
Variable X 1	0,136210452	0,132635902	0,139785003

Tabla No. 16. Límites de confianza del sistema para Cd

Estadísticos de regresión del sistema

Coefficiente de correlación múltiple	0,997887775
Coefficiente de determinación R²	0,995617704
Observaciones	28

Tabla No. 17. Estadísticos de regresión del sistema para Cadmio

5.1.2. Linealidad del método para Cadmio

Se prepararon seis soluciones de matriz blanco, enriquecidas con concentraciones iguales a la curva de calibración del sistema, se realizaron tres replicas para cada nivel de concentración.

CURVAS DEL METODO Cd				
ID MUESTRA	CONC. (µg/L)	SEÑAL (Abs)		
		Lote I	Lote II	Lote III
Blanco	0,00	0,0067	0,0067	0,0078
Estándar 1	0,25	0,0326	0,0310	0,0138
Estándar 2	0,50	0,0800	0,0518	0,0547
Estándar 3	0,80	0,1026	0,0976	0,1030
Estándar 4	1,50	0,2012	0,1965	0,1975
Estándar 5	2,00	0,2778	0,2507	0,2678
Estándar 6	2,50	0,3253	0,3292	0,3268

Tabla No. 18. Curvas de Linealidad del Método Cd

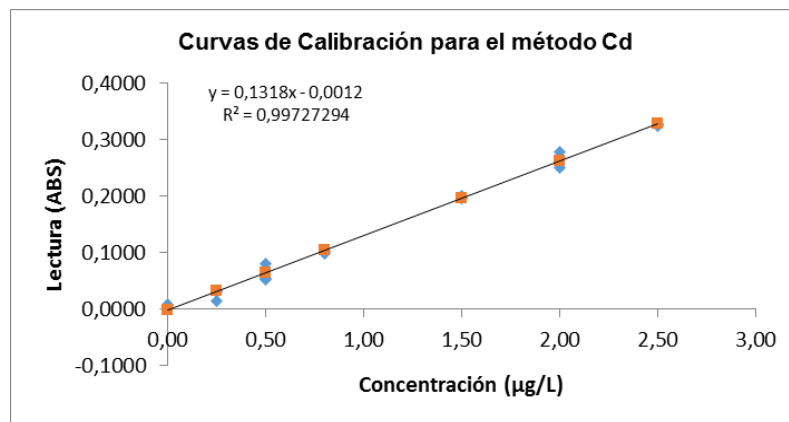


Figura No. 10. Gráfico de linealidad método Cd

Gráfico de residuales del método para Cd

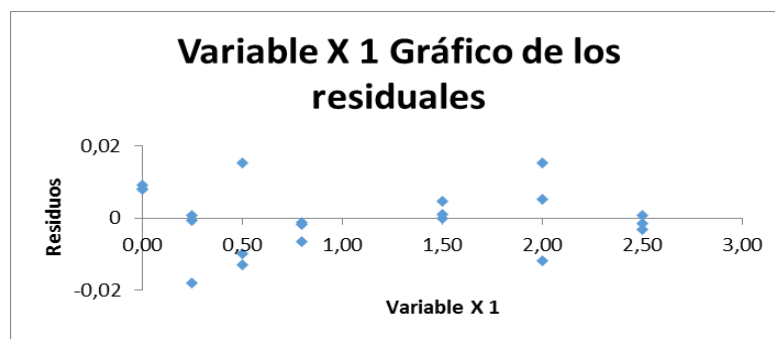


Figura No. 11. Gráfico de residuales método Cd

Análisis de varianza del método

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,276878591	0,276878591	3469,35813	5,63876E-23
Residuos	19	0,00151633	7,98069E-05		
Total	20	0,278394921			

Tabla No. 19. Análisis de varianza del método Cadmio

Límites de confianza del método

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,0011947	-0,007689535	0,005300136
Variable X 1	0,131845713	0,127160647	0,136530778

Tabla No. 20. Límites de confianza del método Cadmio

Estadísticos de regresión del método

Pasos para la prueba de hipótesis: $H_0 : \beta = 0$ $H_a : \beta \neq 0$

$t = b / s_b$ Rechazar H_0 si $t < -t_{\alpha/2}$ o si $t > t_{\alpha/2}$

Coefficiente de correlación múltiple	0,997272937	
Coefficiente de determinación R^2	0,994266643	
Observaciones	21	
	Intercepto	Pendiente
b=	-0,0011947	0,131845713
Sb = Error típico	0,003103087	0,002238419
t	-0,385003585	58,90125746
alfa/2	0.025	0.025
Grados de lib. (n-2)	21-2 = 19	21-2 = 19

Valor critico tabla	2.093	2.093
Valor critico excel	2,093024054	2,093024054
$t_{calc} < t_{tabu}$	No se rechaza Ho	Se rechaza Ho

Tabla No. 21. Estadísticos de regresión del método Cd

5.1.3. Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para Cadmio

Se realizó la medición a un número mínimo de 10 blancos, y se calculó la desviación estándar de la respuesta.

$$LD = 3 \times (s/b)$$

$$LC = 10 \times (s/b)$$

En donde s es la desviación estándar y b la pendiente de la curva de calibración.

CÁLCULO LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	
	SISTEMA
ECUACIÓN DE LA CURVA	ABS= $y = 0,1362x - 0,0028$
PENDIENTE	0,1362
INTERCEPTO	0,0028
Conc ($\mu\text{g/L}$)	(ABS+0,1362/0,0028)
	SEÑAL (ABS)
B-1	0,0021
B-2	0,0011
B-3	0,0067
B-4	0,0078
B-5	0,0076
B-6	0,0067
B-7	0,0021
B-8	0,0095
B-9	0,0090
B-10	0,0092
PROMEDIO	0,00617
DESVEST	0,00322
LDS= $3 \times (s/b) \mu\text{g/L}$	0,07085
LCS= $10 \times (s/b) \mu\text{g/L}$	0,23616
LDS $\mu\text{g/Kg}$	0,3542
LCS $\mu\text{g/Kg}$	1,1808

Tabla No. 22. Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación Cadmio

5.1.4. Verificación de LD y LC para Cadmio

Datos para la verificación del LD

LECTURA µg/L	CONCENTRACIÓN OBTENIDA µg/Kg
0,0794	0,3755
0,0609	0,2998
0,0590	0,2874
0,0735	0,3488
0,0835	0,3995
0,0709	0,3366

Tabla No. 23. Datos para la verificación del LD Cadmio

Datos para la verificación del LC

LECTURA µg/L	CONCENTRACIÓN OBTENIDA µg/Kg
0,2152	1,0512
0,2203	1,0911
0,2200	1,0896
0,2097	1,0276
0,2047	0,9965
0,2155	1,0463

Tabla No. 24. Datos para la verificación del LC Cadmio

Resultados obtenidos en la verificación del límite de detección

FORTIFICACIÓN µg/Kg	LECTURA µg/L	BLANCO PROMEDIO µg/L	CORRECCIÓN BLANCO µg/L	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	% RECUPERACIÓN
				µg/Kg	
0,3455	0,079	0,003	0,076	0,3755	108,7
0,3444	0,061	0,003	0,061	0,2998	87,1
0,3410	0,059	0,003	0,059	0,2874	84,3
0,3477	0,074	0,003	0,070	0,3488	100,3
0,3486	0,084	0,003	0,080	0,3995	114,6
0,3483	0,071	0,003	0,068	0,3366	96,7
PROMEDIO				0,3413	98,60
COEFICIENTE DE VARIACIÓN				12,62	12,03

Tabla No. 25. Verificación del LD Cadmio

Porcentaje de recuperación obtenido en la verificación del límite de detección

Promedio (mg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
0,0003413	98,6	80-110%

Tabla No. 26. Recuperación del LD Cadmio

Coefficientes de variación obtenidos en la verificación del límite de detección

NIVEL (mg/Kg)	PROMEDIO (mg/Kg)	C.V. METODO	C.V. HORWITZ	RESULTADO
0,0003542	0,0003413	12,62	4,70	Rechazado

Tabla No. 27. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LD Cadmio

Resultados obtenidos en la verificación del límite de cuantificación Cd.

FORTIFICACIÓN $\mu\text{g/Kg}$	LECTURA $\mu\text{g/L}$	BLANCO PROMEDIO $\mu\text{g/L}$	CORRECCIÓN BLANCO $\mu\text{g/L}$	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	% RECUPERACIÓN
				$\mu\text{g/Kg}$	
1,0913	0,2152	0,0033	0,2119	1,0512	96,3309
1,0894	0,2203	0,0033	0,2203	1,0911	100,1515
1,0896	0,2200	0,0033	0,2200	1,0896	100,0000
1,0949	0,2097	0,0033	0,2065	1,0276	93,8460
1,0883	0,2171	0,0033	0,2138	1,0578	97,1950
1,0848	0,2155	0,0033	0,2122	1,0463	96,4536
PROMEDIO				1,0606	97,33
COEFICIENTE DE VARIACIÓN				2,37	2,47

Tabla No. 28. Verificación del LC Cd

Porcentaje de recuperación obtenido en la verificación del límite de cuantificación Cd

Promedio (mg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
0,001061	97,3	80-110%

Tabla No. 29. Recuperación del LC Cd

Coefficientes de variación obtenidos en la verificación del límite de cuantificación

NIVEL (mg/Kg)	PROMEDIO (mg/Kg)	C.V. METODO	C.V. HORWITZ	RESULTADO
0,001181	0,001061	2,37	3,96	Aceptable

Tabla No. 30. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LC Cd

5.1.5. Selectividad o especificidad para Cd

Se determinó evaluando la concentración de adicionados de concentración conocida a las cuales se les adicionó la interferencia a evaluar.

PARAMETRO	No DE MUESTRAS	CRITERIOS DE ACEPTACION
Selectividad o especificidad	Tres adicionados con adición de interferencias. Se realizaron las determinaciones por triplicado.	La cuantificación no se debe ver afectada por la presencia de interferentes.

Tabla No. 31. Selectividad o especificidad para Cd

Datos de especificidad y selectividad del fortificado de Cd (sin adición y con interferentes)

Sin adición de interferencias		Interferencias Pb (2,5 µg/L)		Interferencias de Sn (1µg/L)	
Concentración Cd [µg/L]	Concentración Cd [µg/kg]	Concentración Cd [µg/L]	Concentración Cd [µg/kg]	Concentración Cd [µg/L]	Concentración Cd [µg/kg]
0,7866	36,5180	0,7767	37,0430	0,7962	39,3241
0,7805	37,8362	0,7725	36,0919	0,7975	38,1010
0,7810	38,0100	0,7817	36,8664	0,7932	37,9626
PROMEDIO	37,4548	PROMEDIO	36,6671	PROMEDIO	38,4626
DESVIACION ESTANDAR	0,8159	DESVIACION ESTANDAR	0,5059	DESVIACION ESTANDAR	0,7493

Tabla No. 32. Datos de especificidad o selectividad

Coefficientes de variación para el parámetro de especificidad o selectividad.

INTERFERENCIA	PROMEDIO (µg/Kg)	C.V.	C.V. HORWITZ	RESULTADO
F2 (Cd (0,8 µg/L))	37,4548	2,1783	2,3186	Aceptable
Cd (0,8 µg/L) Pb (2,5 µg/L)	36,6671	1,3798	2,3260	Aceptable
Cd (0,8 µg/L) Sn (1 µg/L)	38,4626	1,9481	2,3093	Aceptable

Tabla No. 33. Coeficientes de variación para el parámetro de selectividad Cadmio

Porcentaje de Recuperación obtenidos en especificidad o selectividad.

INTERFERENCIA	PROMEDIO (µg/Kg)	% RECUPERACIÓN	RANGO DE ACEPTACIÓN
F2 (Cd (0,8 µg/L))	37,4548	97,8309	80-110%
Cd (0,8 µg/L) Pb (2,5 µg/L)	36,6671	97,1608	
Cd (0,8 µg/L) Sn (1 µg/L)	38,4626	99,4571	

Tabla No. 34. Recuperación en el parámetro de selectividad

5.1.6.Exactitud y Precisión para Cadmio

Para evaluar los parámetros de precisión intermedia y exactitud (porcentaje de recuperación) se optó por un diseño experimental de seis (6) lotes de fortificados (muestras/soluciones), siendo cada uno de ellos independientes entre sí, es decir que para cada lote se prepararon, las soluciones estándar y se realizó el tratamiento de las muestras.

En cada lote se realizaron análisis por triplicado de las siguientes muestras:

Matriz blanco

Matriz blanco más adicionado (tres niveles de adición correspondientes dentro del rango lineal de estudio).

PARAMETRO	No DE MUESTRAS	ESTADISTICOS	CRITERIOS DE ACEPTACION
Exactitud	6 Lotes conformados por: matriz blanco y matriz blanco más adicionado (3 niveles en el rango de trabajo). Se realizaron las determinaciones por triplicado	% Recuperación	Recuperación entre 80 y 110%
Precisión intermedia		ANOVA	Test de Fisher

Tabla No. 35. Parámetros de exactitud y precisión

Datos de exactitud y precisión intermedia, concentración de 20,0 µg/Kg

	LOTES					
	I	II	III	IV	V	VI
Test 1	18,56	19,35	19,83	18,98	18,89	20,38
Test 2	16,87	19,70	21,12	18,94	18,48	15,89
Test 3	19,10	19,63	20,68	19,89	18,61	20,15
S	1,164	0,186	0,658	0,535	0,211	2,526
S ²	1,355	0,035	0,433	0,287	0,045	6,379
n	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
vS ²	2,711	0,069	0,866	0,573	0,089	12,758

Tabla No. 36. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 20,0 µg/Kg

Datos de exactitud y precisión intermedia, concentración de 40,0 µg/Kg

	LOTES					
	I	II	III	IV	V	VI
Test 1	38,52	39,26	38,55	37,95	36,82	38,06
Test 2	38,55	39,80	37,70	36,29	37,02	40,50
Test 3	39,03	35,21	39,28	38,13	37,02	37,58
S	0,290	2,506	0,790	1,011	0,118	1,571
S ²	0,084	6,281	0,624	1,023	0,014	2,467

v	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
vS^2	0,168	12,562	1,248	2,045	0,028	4,935

Tabla No. 37. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 40,0 $\mu\text{g/Kg}$

Datos de exactitud y precisión intermedia, concentración de 70,0 $\mu\text{g/Kg}$

	LOTES					
	I	II	III	IV	V	VI
Test 1	70,46	69,86	74,86	71,33	76,06	74,70
Test 2	66,51	69,08	71,44	70,01	75,41	72,79
Test 3	78,06	72,08	71,54	68,72	70,30	72,69
S	5,871	1,556	1,945	1,306	3,153	1,137
S^2	34,464	2,420	3,782	1,706	9,944	1,294
v	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
vS^2	68,928	4,840	7,563	3,411	19,887	2,587

Tabla No. 38. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 70,0 $\mu\text{g/Kg}$

Cálculo de cuadrados medios entre y dentro de grupos, concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

Fuente de Variabilidad	Suma de Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (n)	Cuadrados medios (MS)	
Entre los grupos SS_b	1,03E+01	5	$MS_b =$	2,06E+00
Dentro de los grupos SS_w	1,71E+01	12	$MS_w =$	1,42E+00
Total SS_t	2,74E+01	17		

Tabla No. 39. Cuadrados medios concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

Hipótesis nula (H_0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Hipótesis alterna (H_1): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Cálculo del valor de F y comparación con el F crítico, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

$F = MS_b / MS_w$	$F_{0,05}$	Existe diferencia significativa
$F_{calculado}$	$F_{critica}$	
1,4467	3,1059	No

Tabla No. 40. $F_{critico}$, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

Promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	% Recuperación	Rango de aceptación
19,17	99,42	80-110%

Tabla No. 41. Porcentaje de Recuperación, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

Cálculo de cuadrados medios entre y dentro de grupos, concentración 40,0 µg/Kg

Fuente de Variabilidad	Suma de Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (n)	Cuadrados medios (MS)	
Entre los grupos SS _b	7,86E+00	5	MS _b =	1,57E+00
Dentro de los grupos SS _w	2,10E+01	12	MS _w =	1,75E+00
Total SS _t	2,88E+01	17		

Tabla No. 42. Cuadrados medios, concentración de 40,0 µg/Kg

Hipótesis nula (H₀): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 40,0 µg/Kg.

Hipótesis alterna (H₁): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 40,0 µg/Kg.

Cálculo del valor de F y comparación con el F crítico, nivel 40,0 µg/Kg

F=MS_b/MS_w	F_{0.05}	Existe diferencia significativa
F_{calculado}	F_{crítico}	
1,1124	3,1059	No

Tabla No. 43. F_{crítico}, nivel 40,0 µg/Kg

Porcentaje de Recuperación, nivel 40,0 µg/Kg

Promedio (µg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
38,07	99,15	80-110%

Tabla No. 44. Porcentaje de Recuperación, nivel 40,0 µg/Kg

Cálculo de cuadrados medios entre y dentro de grupos, concentración 70,0 µg/Kg

Fuente de Variabilidad	Suma de Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (n)	Cuadrados medios (MS)	
Entre los grupos SS _b	3,84E+01	5	MS _b =	7,67E+00
Dentro de los grupos SS _w	1,07E+02	12	MS _w =	8,93E+00
Total SS _t	1,46E+02	17		

Tabla No. 45. Cuadrados medios concentración 70,0 µg/Kg

Cálculo del valor de F y comparación con el F crítico, nivel 70,0 µg/Kg

F=MS_b/MS_w	F_{0.05}	Existe diferencia significativa
F_{calculado}	F_{crítico}	
1,1646	3,1059	No

Tabla No. 46. F_{crítico}, nivel 70,0 µg/Kg

Porcentaje de Recuperación, nivel 70,0 µg/Kg

Promedio (µg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
71,99	98,75	80-110%

Tabla No. 47. Porcentaje de Recuperación, nivel 70,0 µg/Kg

5.1.7. Repetibilidad para Cadmio

La precisión fue evaluada mediante el análisis de matriz adicionada con tres concentraciones dentro del rango lineal de trabajo en un solo día, el criterio de aceptación para esta determinación es el coeficiente de variación calculado según la ecuación de Horwitz.

Concentración Cd [µg/L]	Concentración Cd [µg/kg]	Concentración Cd [µg/L]	Concentración Cd [µg/kg]	Concentración Cd [µg/L]	Concentración Cd [µg/kg]
MÉTODO					
Nivel I		Nivel II		Nivel III	
0,4152	19,9502	0,7157	34,4518	1,5700	75,6745
0,4125	19,8794	0,7925	38,2707	1,3927	67,3206
0,4068	19,7488	0,8061	39,2150	1,5610	76,0179
0,4160	19,8699	0,8112	38,8220	1,4912	71,4359
0,4106	19,9623	0,7806	38,0287	1,5006	73,1850
0,3986	18,5975	0,7986	37,3399	1,5699	73,4768
0,4050	19,1413	0,7900	37,4159	1,4890	70,5942
0,4272	20,4971	0,7720	37,1075	1,4790	71,1667
0,4126	19,3947	0,7580	35,7005	1,4458	68,1684
0,4110	19,8568	0,8110	39,2648	1,5197	73,6525
PROMEDIO	19,6898		37,5616		72,0692
DESVIACION ESTANDAR	0,5244		1,5404		2,8960

Tabla No. 48. Repetibilidad o Precisión Cd

Coeficientes de variación para repetibilidad.

NIVEL	PROMEDIO (µg/Kg)	C.V. METODO	C.V. HORWITZ	RESULTADO
I	19,6898	2,6631	5,1084	Aceptable
II	37,5617	4,1010	4,6352	Aceptable
III	72,0692	4,0183	4,2021	Aceptable

Tabla No. 49. Coeficiente de variación para repetibilidad Cd

5.1.8. Linealidad del sistema para Pb

Para determinar la linealidad y sensibilidad del sistema se prepararon soluciones de diferentes concentraciones entre 0,2 y 2,5 ppb cubriendo el intervalo de trabajo. Se realizaron tres replicas.

CURVAS DEL SISTEMA Pb				
ID MUESTRA	CONC. (µg/L)	SEÑAL (Abs)		
		Lote I	Lote II	Lote III
Blanco	0,00	0,0021	0,0011	0,0034
Estándar 1	0,25	0,0151	0,0131	0,0127
Estándar 2	0,50	0,0258	0,0274	0,0252
Estándar 3	0,80	0,0451	0,042	0,0414
Estándar 4	1,50	0,0795	0,0797	0,0697
Estándar 5	2,00	0,0927	0,0953	0,0946
Estándar 6	2,50	0,1125	0,1114	0,1192

Tabla No. 50. Curvas Linealidad Sistema Pb

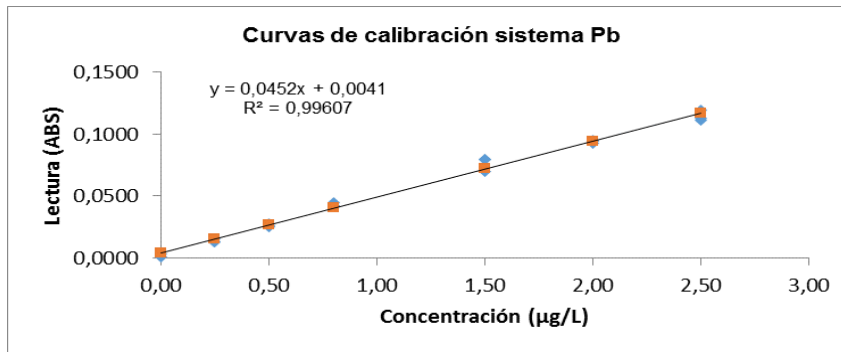


Figura No. 12. Gráfico de linealidad sistema Pb

Gráfico de residuales del sistema para Plomo

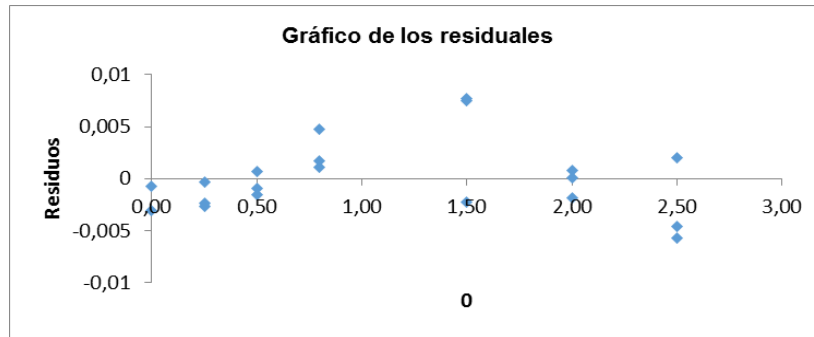


Figura No. 13. Gráfico de residuales sistema Pb

Análisis de varianza del sistema

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,030005287	0,030005286	2277,56874	2,0857E-32
Residuos	18	0,000237151	1,3195E-05		
Total	19	0,030290379			

Tabla No. 51. Análisis de varianza del sistema para Pb

Límites de confianza del sistema

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,00414340	0,001316498	0,00697031
Variable X 1	0,04520538	0,043215329	0,04719543

Tabla No. 52. Límites de confianza del sistema para Pb

Estadísticos de regresión del sistema

Coefficiente de correlación múltiple	0,99607168
Coefficiente de determinación R²	0,9917231
Observaciones	20

Tabla No. 53. Estadísticos de regresión del sistema para Pb

5.1.9. Linealidad del método para Plomo

Se prepararon seis soluciones de matriz blanco, enriquecidas con concentraciones iguales a la curva de calibración del sistema, se realizaron tres replicas para cada nivel de concentración.

CURVAS DEL METODO Pb				
ID MUESTRA	CONC. (ug/L)	SEÑAL (Abs)		
		Lote I	Lote II	Lote III
Blanco	0,00	0,0008	0,0011	0,0002
Estándar 1	0,25	0,0117	0,0134	0,0120
Estándar 2	0,50	0,0240	0,0253	0,0237
Estándar 3	0,80	0,0369	0,0378	0,0362
Estándar 4	1,50	0,0672	0,0677	0,0658
Estándar 5	2,00	0,0867	0,0840	0,0889
Estándar 6	2,50	0,0983	0,1091	0,0999

Tabla No. 54. Curvas Linealidad Método Pb

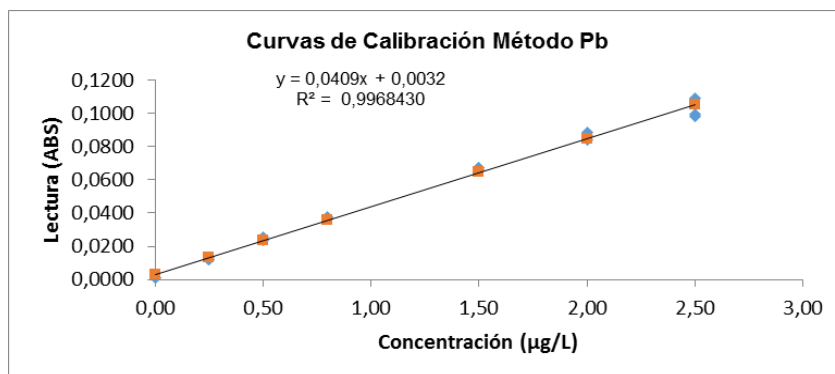


Figura No. 14. Gráfico de linealidad método Pb

Gráfico de residuales del método para Pb

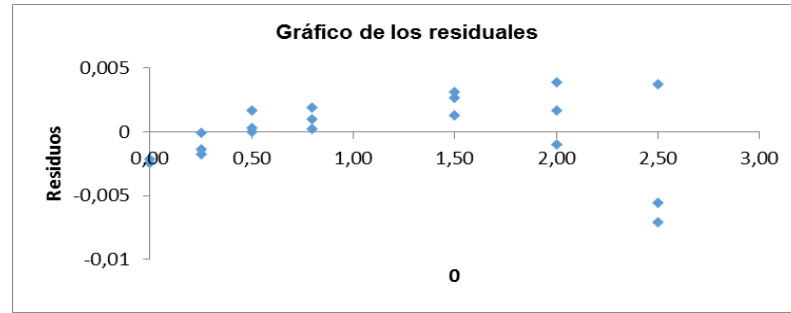


Figura No. 15. Gráfico de residuales método Pb

Análisis de varianza del método

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,02458015	0,02458015	2837,3884	2,92399 E-32
Residuos	18	0,00015593	8,6629E-05		
Total	19	0,02473608			

Tabla No. 55. Análisis de varianza del método para Pb

Límites de confianza del método

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,00323301	0,000942474	0,00552355
Variable X 1	0,04088268	0,039270225	0,04249515

Tabla No. 56. Límites de confianza del método para Pb

Estadísticos de regresión del método

Pasos para la prueba de hipótesis: $H_0 : \beta = 0$ $H_a : \beta \neq 0$

$t = b / s_b$ Rechazar H_0 si $t < -t_{\alpha/2}$ o si $t > t_{\alpha/2}$

Coefficiente de correlación múltiple	0,9968430	
Coefficiente de determinación R^2	0,9933459	
Observaciones	21	
	Intercepto	Pendiente
b=	0,00323301	0,040882689
Sb = Error típico	0,001090253	0,000767503
T	2,96537698	53,2671424
alfa/2	0.025	0.025
Grados de lib. (n-2)	21-2 = 19	21-2 = 19

Valor critico tabla	2.093	2.093
Valor critico Excel	2,093024054	2,093024054
$t_{calc} < t_{tabu}$	No se rechaza Ho	Se rechaza Ho

Tabla No. 57. Estadísticos de regresión del método para Pb

5.1.10. Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para Plomo

Se realizó la medición a un número mínimo de 10 blancos, y se calculó la desviación estándar de la respuesta.

$$LD = 3 \times (s/b)$$

$$LC = 10 \times (s/b)$$

En donde s es la desviación estándar y b la pendiente de la curva de calibración.

CÁLCULO LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	
	SISTEMA
ECUACIÓN DE LA CURVA	ABS= 0,0452x + 0,0041
PENDIENTE	0,0452
INTERCEPTO	0,0041
Conc (ug/L)	(ABS+0,0452/0,0041)
	SEÑAL (ABS)
B-1	0,0002
B-2	0,0011
B-3	0,0017
B-4	0,0008
B-5	0,0018
B-6	0,0037
B-7	0,0021
B-8	0,0015
B-9	0,0010
B-10	0,0049
PROMEDIO	0,00187
DESVEST	0,00142
LDS= 3 *(s/b) µg/L	0,09398
LCS= 10 *(s/b) µg/L	0,31327
LDS µg/Kg	0,4699
LCS µg/Kg	1,5664

Tabla No. 58. Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) Pb

5.1.11. Verificación de LD y LC para Pb

Datos para la verificación del LD

LECTURA µg/L	CONCENTRACIÓN OBTENIDA µg/Kg
0,0971	0,4817
0,0909	0,4466
0,0851	0,4223
0,0850	0,4190
0,0805	0,3986
0,0794	0,3913

Tabla No. 59. Datos para la verificación de LD Pb

Datos para la verificación del LC

LECTURA µg/L	CONCENTRACIÓN OBTENIDA µg/Kg
0,2901	1.3796
0,2833	1.3990
0,3008	1.4899
0,3012	1,5017
0,2910	1,4385
0,2907	1,4379

Tabla No. 60. Datos para la verificación de LC Pb

Resultados obtenidos en la verificación del límite de detección

FORTIFICACIÓN µg/Kg	LECTURA µg/L	BLANCO PROMEDIO µg/L	CORRECCIÓN BLANCO µg/L	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	% RECUPERACIÓN
				µg/Kg	
0,4495	0,0971	0,0007	0,0964	0,4817	107,1612
0,4420	0,0909	0,0007	0,0909	0,4466	101,0378
0,4471	0,0851	0,0007	0,0851	0,4228	94,5589
0,4472	0,0850	0,0007	0,0843	0,4190	93,6861
0,4494	0,0805	0,0007	0,0798	0,3986	88,6884
0,4478	0,0794	0,0007	0,0787	0,3913	87,3946
PROMEDIO				0,4267	95,42
COEFICIENTE DE VARIACIÓN				7,80	7,88

Tabla No. 61. Verificación del LD Pb

Porcentaje de recuperación obtenido en la verificación del límite de detección

Promedio (mg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
0,0004266	95,4	80-110%

Tabla No. 62. Recuperación del LD Pb

Coefficientes de variación obtenidos en la verificación del límite de detección

NIVEL (mg/Kg)	PROMEDIO (mg/Kg)	C. V. METODO	C. V. HORWITZ	RESULTADO
0,0004699	0,0004266	7,798	4,55	Rechazado

Tabla No. 63. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LD Pb

Resultados obtenidos en la verificación del límite de cuantificación.

FORTIFICACIÓN $\mu\text{g/Kg}$	LECTURA $\mu\text{g/L}$	BLANCO PROMEDIO $\mu\text{g/L}$	CORRECCIÓN BLANCO $\mu\text{g/L}$	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	% RECUPERACIÓN
				$\mu\text{g/Kg}$	
1,4300	0,2901	0,0007	0,2894	1,3796	96,4750
1,4817	0,2833	0,0007	0,2833	1,3990	94,4233
1,4859	0,3008	0,0007	0,3008	1,4899	100,2633
1,4993	0,3012	0,0007	0,3005	1,5017	100,1588
1,4865	0,2910	0,0007	0,2903	1,4385	96,7717
1,4874	0,2907	0,0007	0,2900	1,4379	96,6718
PROMEDIO				1,4411	97,46
COEFICIENTE DE VARIACIÓN				3,34	2,36

Tabla No. 64. Verificación del LC Pb

Porcentaje de recuperación obtenido en la verificación del límite de detección

Promedio (mg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
0,001441	97,5	80-110%

Tabla No. 65. Recuperación del LC Pb

Coefficientes de variación obtenidos en la verificación del límite de cuantificación

NIVEL (mg/Kg)	PROMEDIO (mg/Kg)	C. V. METODO	C. V. HORWITZ	RESULTADO
0,001566	0,001441	3,3448	3,7894	Aceptable

Tabla No. 66. Coeficientes de variación obtenidos en la verificación del LC Pb

5.1.12. Selectividad o especificidad para Pb

Se determinó evaluando la concentración de adiciones de concentración conocida a las cuales se les adicionó la interferencia a evaluar.

PARAMETRO	No DE MUESTRAS	CRITERIOS DE ACEPTACION
Selectividad o especificidad	Tres adicionados con adición de interferencias. Se realizaron las determinaciones por triplicado.	La cuantificación no se debe ver afectada por la presencia de interferentes.

Tabla No. 67. Selectividad o especificidad para Pb

Datos de especificidad y selectividad del fortificado de Pb (sin adición y con interferentes)

Sin adición de interferencias		Interferencias Cd (2,5 ug/L)		Interferencias de Sn (1ug/L)	
Concentración Pb [$\mu\text{g/L}$]	Concentración Pb [$\mu\text{g/kg}$]	Concentración Pb [$\mu\text{g/L}$]	Concentración Pb [$\mu\text{g/kg}$]	Concentración Pb [$\mu\text{g/L}$]	Concentración Pb [$\mu\text{g/kg}$]
2,5166	116,8	2,4807	118,3075	2,5146	124,1876
2,4486	118,7	2,5041	116,9933	2,5110	119,9599
2,4310	118,3	2,4671	116,2187	2,5319	121,1783
PROMEDIO	117,9488	PROMEDIO	117,1732	PROMEDIO	121,7753
DESVIACION ESTANDAR	0,9854	DESVIACION ESTANDAR	1,0560	DESVIACION ESTANDAR	2,1761

Tabla No. 68. Datos de especificidad y selectividad

Coefficientes de variación para el parámetro de especificidad o selectividad.

INTERFERENCIA	PROMEDIO ($\mu\text{g/Kg}$)	C.V.	C.V. HORWITZ	RESULTADO
F2 (Pb (2,5 $\mu\text{g/L}$))	117,9488	0,8355	2,7590	Aceptable
Pb (2,5 $\mu\text{g/L}$) Cd (0,8 $\mu\text{g/L}$)	117,1732	0,9012	2,7618	Aceptable
Pb (2,5 $\mu\text{g/L}$) Sn (1 $\mu\text{g/l}$)	121,7753	1,7870	2,7458	Aceptable

Tabla No. 69. Coeficientes de variación para el parámetro de selectividad Pb

Porcentaje de Recuperación obtenidos en especificidad o selectividad.

INTERFERENCIA	PROMEDIO ($\mu\text{g/Kg}$)	% RECUPERACIÓN	RANGO DE ACEPTACIÓN
F2 (Pb (2,5 $\mu\text{g/L}$))	117,9488	98,5853	
Pb (2,5 $\mu\text{g/L}$) Cd (0,8 $\mu\text{g/L}$)	117,1732	99,3557	80-110%
Cd (0,8 $\mu\text{g/L}$) Sn (1 $\mu\text{g/l}$)	121,7753	100,7643	

Tabla No. 70. Recuperación en el parámetro de selectividad

5.1.13. Exactitud y Precisión para Pb

Para evaluar los parámetros de precisión intermedia y exactitud (porcentaje de recuperación) se aplicó por un diseño experimental de seis (6) lotes de fortificados (muestras/soluciones), siendo cada uno de ellos independientes entre sí, es decir que para cada lote se prepararon, las soluciones estándar y se realizó el tratamiento de las muestras.

En cada lote se realizaron análisis por triplicado de las siguientes muestras:

Matriz blanco

Matriz blanco más adicionado (tres niveles de adición correspondientes dentro del rango lineal de estudio).

PARAMETRO	No DE MUESTRAS	ESTADISTICOS	CRITERIOS DE ACEPTACION
<i>Exactitud</i>	6 Lotes conformados por: matriz blanco y matriz blanco más adicionado (3 niveles en el rango de trabajo). Se realizaron las determinaciones por triplicado	% Recuperación	Recuperación entre 80 y 110%
<i>Precisión intermedia</i>		ANOVA	Test de Fisher

Tabla No. 71. Parámetros de exactitud y precisión

Datos de exactitud y precisión intermedia, concentración de 20 µg/Kg

	LOTES					
	I	II	III	IV	V	VI
Test 1	19,74	19,92	19,70	19,95	19,38	19,40
Test 2	19,38	18,58	19,41	19,79	19,96	18,23
Test 3	19,89	19,87	18,76	19,97	19,88	19,40
S	0,264	0,755	0,481	0,102	0,312	0,673
S ²	0,070	0,571	0,231	0,010	0,098	0,453
v	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
vS ²	0,139	1,141	0,462	0,021	0,195	0,906

Tabla No. 72. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 20,0 µg/Kg Pb

Datos de exactitud y precisión intermedia, concentración de 40,0 µg/Kg

	LOTES					
	I	II	III	IV	V	VI
Test 1	38,81	39,24	36,60	39,60	37,47	37,94
Test 2	38,79	39,18	39,38	39,69	38,20	39,94
Test 3	39,59	39,72	38,71	39,60	37,03	36,72
S	0,457	0,294	1,448	0,051	0,590	1,623
S ²	0,209	0,086	2,098	0,003	0,348	2,635

v	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
vS^2	0,418	0,173	4,196	0,005	0,697	5,269

Tabla No. 73. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 40,0 $\mu\text{g/Kg Pb}$

Datos de exactitud y precisión intermedia, concentración de 125,0 $\mu\text{g/Kg}$

	LOTES					
	I	II	III	IV	V	VI
Test 1	122,47	124,84	124,98	125,00	124,90	124,27
Test 2	124,44	124,86	124,61	123,82	123,03	124,44
Test 3	123,82	124,92	119,03	122,90	124,53	122,28
S	1,004	0,043	3,331	1,052	0,990	1,201
S^2	1,008	0,002	11,094	1,106	0,981	1,442
v	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
vS^2	2,015	0,004	22,188	2,213	1,962	2,883

Tabla No. 74. Parámetros de exactitud y precisión intermedia concentración de 125,0 $\mu\text{g/Kg Pb}$

Cálculo de cuadrados medios entre y dentro de grupos, concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

Fuente de Variabilidad	Suma de Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (n)	Cuadrados medios (MS)
Entre los grupos SS_b	1,60E+00	5	$MS_b = 3,20E+01$
Dentro de los grupos SS_w	2,86E+00	12	$MS_w = 2,39E+01$
Total SS_t	4,46E+00	17	

Tabla No. 75. Cuadrados medios concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg Pb}$

Hipótesis nula (H_0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Hipótesis alterna (H_1): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 20,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Cálculo del valor de F y comparación con el F crítico, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

$F = MS_b / MS_w$	$F_{0.05}$	Existe diferencia significativa
$F_{calculado}$	$F_{critical}$	
1,340	3,1059	No

Tabla No. 76. $F_{critical}$, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg Pb}$

Porcentaje de Recuperación, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg}$

Promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	% Recuperación	Rango de aceptación
19,51	99,70	80-110%

Tabla No. 77. Porcentaje de Recuperación, nivel 20,0 $\mu\text{g/Kg Pb}$

Calculo de cuadrados medios entre y dentro de grupos, concentración 40,0 µg/Kg

Fuente de Variabilidad	Suma de Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (n)	Cuadrados medios (MS)	
Entre los grupos SS _b	9,67E+00	5	MS _b =	1,93E+00
Dentro de los grupos SS _w	1,08E+01	12	MS _w =	8,96E+00
Total SS _t	2,04E+01	17		

Tabla No. 78. Cuadrados medios, concentración de 40,0 µg/Kg Pb

Hipótesis nula (H₀): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 40,0 µg/Kg.

Hipótesis alterna (H₁): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 40,0 µg/Kg.

Cálculo del valor de F y comparación con el F crítico, nivel 40,0 µg/Kg

F=MS_b/MS_w	F_{0,05}	Existe diferencia significativa
F_{calculado}	F_{crítico}	
2,157	3,1059	No

Tabla No. 79. F_{crítico}, nivel 40,0 µg/Kg Pb

Porcentaje de Recuperación, nivel 40,0 µg/Kg

Promedio (µg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
38,68	96,7	80-110%

Tabla No. 80. Porcentaje de Recuperación, nivel 40,0 µg/Kg Pb

Calculo de cuadrados medios entre y dentro de grupos, concentración 125,0 µg/Kg

Fuente de Variabilidad	Suma de Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (n)	Cuadrados medios (MS)	
Entre los grupos SS _b	6,62E+00	5	MS _b =	1,32E+00
Dentro de los grupos SS _w	3,13E+01	12	MS _w =	2,613E+00
Total SS _t	3,79E+01	17		

Tabla No. 81. Cuadrados medios concentración 125,0 µg/Kg Pb

Cálculo del valor de F y comparación con el F crítico, nivel 125,0 µg/Kg

F=MS_b/MS_w	F_{0,05}	Existe diferencia significativa
F_{calculado}	F_{crítico}	
1,966	3,1059	No

Tabla No. 82. F_{crítico}, nivel 125,0 µg/Kg

Porcentaje de Recuperación, nivel 125,0 µg/Kg

Promedio (µg/Kg)	% Recuperación	Rango de aceptación
122,35	98,75	80-110%

Tabla No. 83. Porcentaje de Recuperación, nivel 125,0 µg/Kg Pb

5.1.14. Repetibilidad para Plomo

La precisión fue evaluada mediante el análisis de matriz adicionada con tres concentraciones dentro del rango lineal de trabajo en un solo día, el criterio de aceptación para esta determinación es el coeficiente de variación calculado según la ecuación de Horwitz.

Concentración Pb [µg/L]	Concentración Pb [µg/kg]	Concentración Pb [µg/L]	Concentración Pb [µg/kg]	Concentración Pb [µg/L]	Concentración Pb [µg/kg]
MÉTODO					
Nivel I		Nivel II		Nivel III	
0,4152	20,4047	0,7486	36,2330	2,5700	125,8195
0,4125	19,8987	0,7619	36,8636	2,4593	122,3257
0,4068	20,1444	0,8006	39,5387	2,4610	121,7995
0,4160	20,6268	0,7620	37,2965	2,4912	124,3165
0,4106	18,9934	0,7706	37,6530	2,4436	121,9524
0,3986	19,7131	0,7896	39,1177	2,4799	123,8315
0,4050	19,8647	0,7711	36,6247	2,4890	124,3465
0,4272	20,6503	0,7342	33,5141	2,4790	123,4725
0,4126	19,2743	0,7558	37,1204	2,4458	116,3714
0,4110	20,2628	0,7713	37,2333	2,4620	119,2559
PROMEDIO	19,9833		37,1195		122,3491
DESVIACION ESTANDAR	0,5495		1,6421		2,7714

Tabla No. 84. Repetibilidad o Precisión Pb

Coeficientes de variación para repetibilidad.

NIVEL	PROMEDIO (µg/Kg)	C.V. METODO	C.V. HORWITZ	RESULTADO
I	19,9833	2,7498	8,0700	Aceptable
II	37,1195	4,4239	4,6434	Aceptable
III	122,3491	2,2651	3,8804	Aceptable

Tabla No. 85. Coeficiente de variación para repetibilidad Pb

5.2. Muestras de leches analizadas

Se analizaron muestras de leches líquidas que son comercializadas en la ciudad de Bogotá D.C. Dichas muestras provienen de diferentes productores así como de diferentes marcas. Existen alrededor de 63 marcas de leches líquidas distribuidas en Bogotá de diferentes clases, tal y como se observa en la Tabla No. 5. En la Figura No. 16. se visualiza el porcentaje de la clase de leche que se distribuye de estas 63 marcas; sin embargo, se debe tener en cuenta que algunas de estas marcas distribuyen dos clases o las tres clase de leches; a decir, dos marcas de leche distribuyen leche clase pasteurizada y UHT, otras dos marcas de leche distribuyen las tres clases de leche y 29 marcas de leche se distribuyen en clase UHT y deslactosada. Dicho de otra manera un 55,6% de leche es deslactosada es decir unas 35 marcas, un 55,6 % de clase UAT/UHT es decir 35 marcas y un 42,9% pasteurizada es decir 27 marcas de las 63 distribuidas en Bogotá.

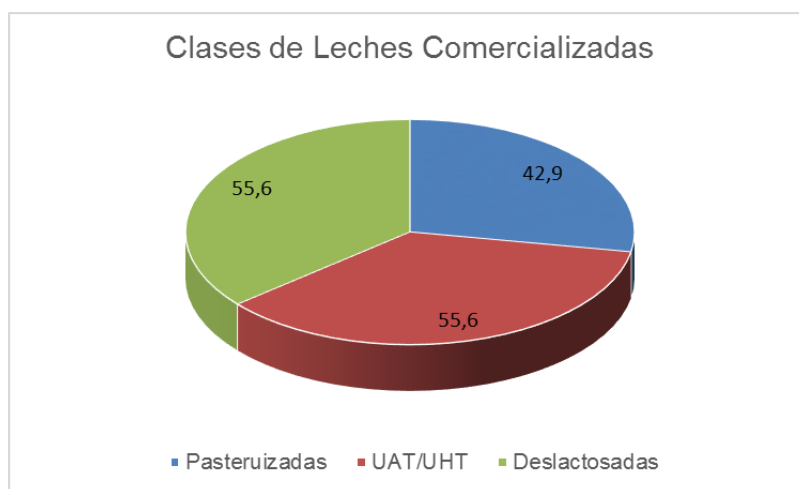


Figura No. 16. Distribución por clase de leche líquida comercializada en Bogotá

De las 63 marcas distribuidas en Bogotá se encuentran solo 33 productoras de leche líquida comercializada de diferente clase. Las muestras analizadas en este estudio abarcaron el 81 % de las marcas distribuidas de leche en Bogotá y el 94% de las productoras de leche líquida.

Las muestras fueron identificadas como ID Muestra. La muestra número uno fue identificada como ID Muestra 1C. El número 1 corresponde a la primera réplica y la C corresponde a Comercializada. El -2 corresponde a la réplica dos o al duplicado de la muestra.

5.3. Determinación de los niveles de Cd y Pb en las muestras de leche recolectadas en la ciudad de Bogotá D.C

Una vez el método para la determinación de Pb y Cd fue validado, se procedió a trabajar con las muestras a partir del muestreo establecido. Se siguió el Ítem 4.3. y 4.4 y se realizó la lectura de las muestras. A continuación se muestra los niveles encontrados en las muestras de estudio.

<i>Muestra</i>	<i>Concentración Cd (µg/L)</i>	<i>Promedio (µg/Kg)</i>	<i>Concentración Pb (µg/L)</i>	<i>Promedio (µg/kg)</i>
ID Muestra 1C	-0,0508	0,000	0,0617	0,000
ID Muestra 1C-2	-0,0315		0,1016	
ID Muestra 2C	-0,0529	0,000	0,0479	0,000
ID Muestra 2C-2	-0,0186		0,0575	
ID Muestra 3C	-0,0401	0,000	0,1281	7,135
ID Muestra 3C-2	-0,0186		0,1615	
ID Muestra 4C	-0,0551	0,000	0,0340	0,000
ID Muestra 4C-2	-0,0315		0,0815	
ID Muestra 5C	-0,0637	0,000	0,0522	0,000
ID Muestra 5C-2	-0,0358		0,0706	
ID Muestra 6C	-0,0272	0,000	0,0752	0,000
ID Muestra 6C-2	-0,0294		0,0983	
ID Muestra 7C	-0,0058	0,000	0,0236	0,000
ID Muestra 7C-2	-0,0315		0,0102	
ID Muestra 8C	-0,0272	0,000	0,0053	0,000
ID Muestra 8C-2	-0,0315		0,0153	
ID Muestra 9C	-0,0486	0,000	0,0068	0,000
ID Muestra 9C-2	-0,0315		0,0098	
ID Muestra 10C	-0,0572	0,000	0,0093	0,000
ID Muestra 10C-2	-0,0615		0,0170	
ID Muestra 11C	-0,0422	0,000	0,0119	0,000
ID Muestra 11C-2	-0,0315		1,0119	
ID Muestra 12C	-0,0401	0,000	0,0086	0,000
ID Muestra 12C-2	-0,0444		0,0086	
ID Muestra 13C	-0,0508	0,000	0,0046	0,000
ID Muestra 13C-2	-0,0379		0,0052	
ID Muestra 14C	-0,0551	0,000	0,0108	0,000
ID Muestra 14C-2	-0,0508		0,0703	
ID Muestra 15C	-0,0615	0,000	0,0051	0,000
ID Muestra 15C-2	-0,0551		0,0328	
ID Muestra 16C	-0,0272	0,000	0,0067	0,000

ID Muestra 16C-2	-0,0165		0,0097	
ID Muestra 17C	-0,0594	0,000	0,0101	0,000
ID Muestra 17C-2	-0,0315		0,0106	
ID Muestra 18C	-0,0379	0,000	0,0198	0,000
ID Muestra 18C-2	-0,0315		0,0133	
ID Muestra 19C	-0,0551	0,000	0,0093	0,000
ID Muestra 19C-2	-0,0444		0,0082	
ID Muestra 20C	-0,0551	0,000	0,0055	0,000
ID Muestra 20C-2	-0,0572		0,0113	
ID Muestra 21C	-0,0529	0,000	0,0066	0,000
ID Muestra 21C-2	-0,0336		0,0137	
ID Muestra 22C	-0,0422	0,000	0,0071	0,000
ID Muestra 22C-2	-0,0465		0,0087	
ID Muestra 23C	-0,0465	0,000	0,0192	0,000
ID Muestra 23C-2	-0,0486		0,0122	
ID Muestra 24C	-0,0529	0,000	0,0072	0,000
ID Muestra 24C-2	-0,0551		0,0153	
ID Muestra 25C	-0,0658	0,000	0,0072	0,000
ID Muestra 25C-2	-0,0744		0,0109	
ID Muestra 26C	-0,0572	0,000	0,0092	0,000
ID Muestra 26C-2	-0,0722		0,1159	
ID Muestra 27C	-0,0486	0,000	0,0051	0,000
ID Muestra 27C-2	-0,0272		0,0154	
ID Muestra 28C	-0,0336	0,000	0,0160	0,000
ID Muestra 28C-2	-0,0465		0,0125	
ID Muestra 29C	-0,0740	0,000	0,9209	0,000
ID Muestra 29C-2	-0,0764		0,9852	
ID Muestra 30C	-0,0585	0,000	0,1782	7,572
ID Muestra 30C-2	-0,0526		0,1505	
ID Muestra 31C	0,0450	0,000	0,9824	0,000
ID Muestra 31C-2	-0,0478		0,7979	
ID Muestra 32C	-0,0716	0,000	-1,9493	0,000
ID Muestra 32C-2	-0,0645		-3,2992	
ID Muestra 33C	-0,0609	0,000	-0,3172	0,000
ID Muestra 33C-2	-0,0811		-0,2361	
ID Muestra 34C	-0,0526	0,000	-0,0992	0,000
ID Muestra 34c-2	-0,0585		-0,0433	
ID Muestra 35	-0,0347	0,000	-0,1048	0,000
ID Muestra 35C-2	-0,0395		-0,2277	
ID Muestra 36C	-0,0383	0,000	0,0573	9,133
ID Muestra 36C-2	-0,0395		0,3256	

ID Muestra 37C	-0,0776	0,000	0,2585	6,027
ID Muestra 37C-2	-0,0764		-0,0125	
ID Muestra 38C	-0,0609	0,000	-0,4904	0,000
ID Muestra 38C-2	-0,0466		-0,8090	
ID Muestra 39C	-0,0704	0,000	-2,5138	0,000
ID Muestra 39C-2	-0,0573		-2,2707	
ID Muestra 40C	-0,0811	0,000	0,3787	14, 194
ID Muestra 40C-2	-0,0657		0,3583	
ID Muestra 41C	-0,0716	0,000	0,1076	17,099
ID Muestra 41C-2	-0,0681		0,5799	
ID Muestra 42C	-0,0514	0,000	-0,0796	0,000
ID Muestra 42C-2	-0,0383		-0,0084	
ID Muestra 43C	-0,0550	0,000	-11,6162	0,000
ID Muestra 43C-2	-0,0442		-0,0600	
ID Muestra 44C	-0,0300	0,000	-0,3228	0,000
ID Muestra 44C-2	-0,0264		0,2613	
ID Muestra 45C	0,3716	19,904	-0,1383	0,000
ID Muestra 45C-2	0,4387		-0,2501	
ID Muestra 46C	-0,0692	0,000	-0,0573	0,000
ID Muestra 46C-2	-0,0609		-0,2417	
ID Muestra 47C	-0,0490	0,000	-0,2249	0,000
ID Muestra 47C-2	-0,0407		-0,2110	
ID Muestra 48C	-0,0526	0,000	0,0014	0,000
ID Muestra 48C-2	-0,0597		-0,1439	
ID Muestra 48C	-0,3538	0,000	-0,3032	0,000
ID Muestra 48C-2	-0,5050		-0,3144	
ID Muestra 49C	0,2045	14,446	-0,0824	0,000
ID Muestra 49C-2	0,3846		-0,3228	
ID Muestra 50C	0,2913	13,862	-0,2305	6,080
ID Muestra 50C-2	0,2661		-0,3451	
ID Muestra 51C	-0,0347	0,000	-0,2864	0,767
ID Muestra 51C-2	-0,0550		-0,1495	

Tabla No. 86. Niveles de Cd y Pb en muestras comerciales de leche líquida procesada

5.4. Implicaciones toxicológicas

De acuerdo a los niveles encontrados en las muestras de leche analizadas realizamos una aproximación del riesgo al cual se puede estar expuesto por el consumo de las leches potencialmente contaminadas. Esta aproximación se realizó teniendo en cuenta los niveles de ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) mencionada en la Tabla No. 3

del texto. De esta manera relacionamos los μg totales diarios tolerables y el posible aporte eventual por el consumo de un vaso de dicha leche con niveles del metal. Cabe mencionar que esto es solo posible en el hipotético caso que el consumidor tome la leche de este mismo lote de producto. Por otro lado se tomó en cuenta que cada litro de leche pesa 1 kg y puede aportar alrededor de 10 vasos de leche.

Las implicaciones toxicológicas por el consumo de metales son bien conocidas como ya se mencionó en el marco conceptual del texto, por cualquier medio a la cual se esté expuesto; es importante aclarar que los efectos adversos se verán repercutidos si es de manera aguda o de manera crónica su exposición. En el caso particular es poco probable de que exista una intoxicación aguda por el consumo de estos contaminantes en las muestras de leche analizadas.

<i>Metal</i>	<i>ISTP $\mu\text{g}/\text{kg}$</i>	<i>μg Totales</i>		<i>Ingesta Diaria μg</i>		<i>Aporte $\mu\text{g}/\text{kg}$</i>	<i>Aproximación</i>	
		<i>Niño (25 kg)</i>	<i>Adulto (70kg)</i>	<i>Niño (25 kg)</i>	<i>Adulto (70kg)</i>		<i>μg por vaso</i>	<i>Riesgo</i>
Cd	7	175	490	25	70	13 - 19	1,3	No
Pb	50	1250	3500	178	500	6 - 17	0,6	No

Tabla No. 87. Aproximación de los niveles aportados de metales por vaso de leche

6. Análisis y discusión de resultados

Los habitantes de la ciudad de Bogotá cuentan con un abastecimiento de leche comercializada de diferentes procedencias; principalmente del Valle de Ubaté; alrededor de 33 productoras de leche comercializan diferentes tipos de leches y diferentes marcas en Bogotá las cuales son vistas en los centros de ventas donde se comercializa este producto. Debido al alto impacto nutricional de este alimento, la gran accesibilidad y las diferentes tipos y presentaciones; la mayoría de los habitantes consume este alimento en indistintas edades y proporciones. La calidad e inocuidad de la leche comercializada en Bogotá es monitoreada por la Secretaria Distrital de Salud de Bogotá; donde cuentan con un plan de monitoreo de leche comercializada y cruda a nivel distrital y evalúan diferentes parámetros fisicoquímicos y microbiológicos; sin embargo, dentro de los parámetros fisicoquímicos evaluados en dicho monitoreo no se encuentra la determinación de los niveles de metales que pueda tener este alimento. El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es el ente encargado de evaluar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de inocuidad de los productos en primera barrera; es este el caso de la leche cruda que se consume a nivel nacional; asegurando las Buenas Prácticas Agrícolas de las fincas, y diferentes eslabones en la cadena láctea a saber: proveedores de insumos, sistemas productivos, centros de acopio, plantas procesadoras, comercializadores y consumidores.

Es claro que el crecimiento industrial ha causado un incremento en la contaminación del ambiente; sumado a las actividades agrícolas y otras fuentes de contaminación y que a su vez esta contaminación ambiental en gran parte precede a la contaminación de alimentos de origen animal y vegetal. Existe evidencia clara de que diferentes regiones del mundo se ha registrado la presencia de diferentes contaminantes o tóxicos en varios alimentos hortofrutícolas así como en alimentos de origen animal. La leche no es una excepción para dicha afirmación, tal y como es publicado a nivel internacional (*Tripathi R.M, 1999; Soares V.A, 2010; Rodriguez H.R, 2005; Rey-Crespo F, 2013; Rahimi E., 2013, 2013, Pereira J.S.F, 2013, Mass S, 2010; Licataa P, 2004, Bilandžić N, 2011*); sin embargo, a nivel nacional los reportes acerca de un estudio relacionado con metales en este alimento no han sido reportados con excepción de la investigación realizada por Carvajal S, del 2012 (*Carvajal S.,2012*) donde muestra el uso de un biosensor amperométrico como herramienta eficaz y rápida para la determinación de Cd en leche cruda con aras de ayudar a un mejoramiento de la calidad de la leches crudas de la Cooperativa Lechera de Antioquia (COLANTA) donde se concluye la baja sensibilidad del método usado pero la viabilidad del método para ser utilizado para la determinación de los niveles de Cd en leches.

La determinación de las concentraciones de metales residuales en la leche puede ser un indicador importante directo de la condición higiénica e inocua de la leche y/o de sus

productos derivados, así como un indicador indirecto del grado de la contaminación del medio ambiente en el que se produce la leche.

En humanos la deficiencia o exceso de un oligoelemento puede ser influyente para los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de otros. Un ejemplo claro es la conocida anemia hipocrómica, producida por la deficiencia de Fe, que particularmente causa el aumento de la absorción de Pb y Cd en el tracto gastrointestinal (*Sebehat, 2008*).

La absorción de Cd por las plantas en suelos contaminados y su incorporación a la cadena alimenticia, tiene actualmente mucha importancia debido a que este elemento puede alterar el metabolismo humano compitiendo con el Fe, Cu, Zn, Mn y Se por ligantes en los sistemas biológicos. Adicionalmente el Cd divalente disminuye significativamente la absorción intestinal del Fe en el cuerpo humano. Cuando se ingiere un alimento contaminado con Cd este se acumula en los riñones donde su vida media de permanencia es de 18 a 30 años, lo que demuestra su gran dificultad para la eliminación de este del organismo. Por otro lado, el Pb causa problemas en el desarrollo del sistema nervioso central del feto. En recién nacidos, el Pb puede causar daños al cerebro y a los nervios periféricos que son los encargados de enviar la información sensorial (tacto, dolor) del cuerpo hacia el sistema nervioso central a través de la médula espinal. En los niños la exposición al Pb ha sido asociada con el coeficiente intelectual reducido, desórdenes de aprendizaje, crecimiento lento, comportamiento hiperactivo, antisocial y deterioro del oído (*Mounicou, 2003; Martínez G, 2010*).

La presencia de metales pesados como Cd y Pb, es ampliamente relacionada con la salud pública y ambiental; se han publicado casos de intoxicación por Cd con concentraciones de 20 mg/kg que tiene como consecuencia daños graves en órganos internos y alteraciones genéticas (*Shuman, 2002*). Estudios poblacionales sobre toxicidad y la acumulación de Cd sugieren que un considerable número de individuos presenta niveles de Cd en riñones; afirmando que si la incorporación de este metal en la dieta continúa, en los próximos diez a veinte años se prevé un aumento en los casos de disfunción tubular renal particularmente en grupos de riesgo elevado tales como diabéticos y personas con bajo consumo de vitamina C (*Soisungwan, S., 2000*).

Estudios recientes soportan la presencia de metales pesados en los suelos y aguas de las zonas aledañas al río Bogotá pudiendo llegar estos contaminantes a los animales que se encuentran ubicados en estas zonas y que a su vez se alimentan de los productos que crecen allí. De acuerdo al estudio realizado por Miranda y colaboradores se observó en el agua de riego, proveniente del río Bogotá, que las concentraciones de metales pesados, especialmente el Cd, están cercanas a los límites establecidos por las normas vigentes nacionales e internacionales. Los resultados mostraron incrementos considerables con respecto a los determinados anteriormente por la CAR en diversos sectores de la cuenca del río Bogotá (*Miranda 2008*). Por otro lado, los lodos ribereños de la zona media del río Bogotá y Tunjuelito exceden los niveles de metales como Cr, Pb y Hg influenciando fuertemente en la calidad de los suelos en la sabana de Bogotá (*Soto*

2010). Cabe mencionar que en la zona del Cauca se ha demostrado que productos alimenticios como lo es el cacao exceden los niveles establecidos por la OMS para el caso del Cd (*Martínez R 2010*). En un estudio realizado por Corpoica señalan que el Cd y el As se encuentran en niveles tóxicos en los suelos, cultivos y bovinos, lo que constituye una amenaza para la salud de los animales y hombres que consuman estos alimentos contaminados, adicionalmente que el Pb no se encuentra en niveles tóxicos en la mayoría de los suelos y cultivos pero es importante tomar precauciones para evitar el creciente proceso debido a su alta toxicidad. Dichos elementos posiblemente son producto de las aguas del río Bogotá ya que son la única fuente utilizada para riego en la planicie aluvial baja del mismo en cultivos de pastos, arroz y plátano, principalmente (*García E.J, Corpoica*). De igual manera Lora et al. Identifican zonas de la cuenca alta del río Bogotá entre el trayecto de Villapinzón y Bosa con contenido de Cd y Cr medianamente altos (*Lora 2010*).

Basado en las anteriores antecedentes y teniendo en cuenta que no se encuentra información relacionada con la determinación de metales pesados en leche en Colombia resulta pertinente el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Pb y Cd y su aplicación en la determinación de los niveles de estos metales en productos comercializados en Bogotá.

La metodología de espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de metales es ampliamente utilizada en diferentes ámbitos, en el área de alimentos es utilizada tanto en llama como en horno de grafito. La metodología para la Determinación de Pb, Cd, Zn, Cu y Fe mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) tras digestión en microondas está normalizada como lo documenta la norma española UNE-EN-14084: 2003; así como por el método oficial AOAC Official Method 999.10. 2012. El Laboratorio de Toxicología del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional cuenta con los medios físicos y analíticos para emplear esta metodología; lo cual fue demostrado bajo los parámetros analíticos de validación empleados en este trabajo.

El método para la determinación de los niveles de Cd y Pb en leche líquida comercializada se desarrolló en el equipo de Absorción Atómica Thermo iCE 3400 AA con Horno Grafito GF95 y sistema de refrigeración, automuestreador para el horno de grafito FS95, lámpara de Deuterio, lámpara de cátodo hueco de Cd, lámpara de cátodo hueco de Pb y cubetas (tubos) de grafito recubiertas pirolíticamente. El método es asistido con digestión acida por horno microondas marca CEM modelo MARS-5; las condiciones de operación del equipo para la determinación de Cd y Pb son mostradas en la Tabla No. 8 y Tabla No. 11 respectivamente; así como el programa del horno para la determinación de Cd es mostrado en la Tabla No. 9 para la determinación de Cd y en la Tabla No. 12 para Pb.

Como se trata de una modificación de un método normalizado, el objetivo es la comprobación de que la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia y la exactitud del método original no dependen de la modificación introducida y que el

laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente. Los parámetros analizados fueron: selectividad, modelo de calibración (linealidad), exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límite de cuantificación (LC), límite de detección (LD), exactitud como % recuperación. Estos parámetros de validación se evaluaron en la metodología analítica para la determinación y cuantificación de Cd y Pb en muestras de leche líquida procesada comercializada. Todos los datos fueron procesados en el momento del análisis por el Espectrofotómetro de Absorción atómica con el SOLAAR AA Software Version 11.03 de Thermo Scientific. El análisis y tratamiento de datos para la validación fue realizado con la hoja de cálculo en Excel 2013 de Microsoft Office 2013.

De acuerdo a los datos de selectividad el método demostró que la cuantificación de los niveles de Cd y Pb no es afectada por la presencia de interferentes. En la Tabla No. 32 se observan los datos de las muestras de Cd sin interferencias, con la presencia de interferentes como el Pb que absorbe a una diferente longitud de onda, y con el Sn que absorbe a una longitud de onda cercana a la cual se realiza la lectura del Cd en el equipo. Igualmente en la Tabla no. 33 se observan los coeficientes de variación comparados con los coeficientes de variación de Hortwitz; los cuales en los tres casos estudiados para este parámetro son aceptables a las concentraciones analizadas. En la Tabla No. 69 se observan los datos de las muestras de Pb sin interferencias, con la presencia de interferentes como el Cd y con el Sn que absorben a una diferente longitud de onda a la cual se realiza la lectura del Pb en el equipo. Igualmente en la Tabla No. 70 se observan los coeficientes de variación comparados con los coeficientes de variación de Hortwitz; los cuales en los tres casos estudiados para este parámetro son aceptables a las concentraciones analizadas. De este modo se concluye que la metodología es selectiva para la determinación de Cd y Pb para la leche líquida.

El rango lineal del sistema y del método fue establecido entre 0,2 a 2,5 $\mu\text{g/L}$ para ambos metales. Las curvas de linealidad del Sistema para Cd se evidencian en la Figura No. 8 y en la Figura No. 11 se muestra la linealidad del método para Cd. En las Figuras No. 12 y No. 14 se muestra las curvas de linealidad el sistema y del método para Pb respectivamente. La idoneidad del modelo de calibración elegido se confirmó por los test estadísticos para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación, además se determinaron las desviaciones estándar con sus respectivos intervalos de confianza, los cuales son indicados en las Tablas No. 16, 17, 20 y 21 para el Cd y en las Tablas No. 53, 54, 57 y 58 para el Pb.

La gráfica de residuales nos muestra aleatoriedad (*Figura No. 9 y No. 11 para Cd y Figura No. 13 y 15 para el Pb*), se evidencia homogeneidad en todos los datos de las curvas de calibración indicándonos la linealidad del sistema y del método, adicionalmente en ambos casos se obtiene un coeficiente de correlación mayor a 0.995 para ambos metales tanto en sistema como para método. En conclusión la metodología es lineal en el rango lineal de 0,2 a 2,5 $\mu\text{g/L}$ para ambos metales estudiados.

El valor de la pendiente en el ensayo de linealidad del método es menor a la pendiente en el ensayo de linealidad del sistema (pero muy similares), lo que nos muestra un muy

ligero el efecto matriz, sin que este afecte en términos de exactitud y precisión a la metodología.

El límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) para la metodología de análisis de Cd y Pb se evaluó siguiendo los lineamientos por la Guía Eurachem y se ven reflejados en la Tabla No. 22 para el caso del Cd y en la Tabla No. 59 para el Pb obteniéndose un LD de 0,000354 mg/Kg y un LC de 0,001181 mg/Kg para Cd y un LD de 0,000469 mg/Kg y un LC de 0,001566 mg/Kg para el caso del Pb. Los LD y LC fueron verificados en ambos casos realizando ensayos de concentraciones similares de muestras fortificadas (*Tablas No. 23 y 24 para Cd y Tablas No. 60 y 61 para Pb*) y evaluando el coeficiente de variación de las réplicas comparándolas con el coeficiente de variación de Hortwitz; lo que demostró que en los LD este parámetro rechazó el resultado y para los LC el parámetro es aceptable (Ver Tablas No. 27, 30, 64 y 67).

La evaluación de la precisión para ambos metales, en términos de precisión intermedia muestra que al realizar un análisis de varianza de 6 lotes independientes en tres niveles de concentración diferente, no se encuentra diferencia significativa en ningún lote, por lo tanto queda satisfecho este parámetro de desempeño del método para la matriz leche líquida. Los resultados de este parámetro para el caso del Cd en concentraciones de 20,0; 40,0 y 70,0 $\mu\text{g/Kg}$ (*Tablas No. 36, 37, 38*) muestran que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para los niveles de concentración evaluados. Los resultados de este parámetro para el caso del Pb en concentraciones de 20,0; 40,0 y 125,0 $\mu\text{g/Kg}$ (*Tablas No. 73, 74, 75*) muestran que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para los niveles de concentración evaluados. Los porcentajes de recuperación en los ensayos realizados para se encuentran entre el 98,7 al 99,1 % para el Cd y para el Pb están entre el 98,7 y 99,7%. En todos los niveles para ambos metales se cumplieron los criterios establecidos de aceptación correspondientes.

La evaluación de la precisión, en términos de repetibilidad muestra que al trabajar 10 réplicas en tres niveles diferentes de concentración los coeficientes de variación hallados para ambos metales son inferiores a los estimados según el coeficiente de variación de Horwitz, por lo tanto queda satisfecho este parámetro de desempeño del método para la matriz leche líquida comercializada. La Tabla No. 49 muestra los datos de repetibilidad del Cd y la Tabla No. 50 muestra que el criterio de aceptación de los coeficientes de variación de Hortwitz es aceptable en los tres niveles evaluados. La Tabla No. 85 muestra los datos de repetibilidad del Pb y la Tabla No. 86 muestra que el criterio de aceptación de los coeficientes de variación de Hortwitz es aceptable en los tres niveles evaluados.

De acuerdo a los parámetros evaluados en la validación de la metodología para determinar los niveles de Cd y Pb en leche líquida comercializada del Laboratorio de Toxicología se demuestra que la metodología es apta para el fin previsto y los resultados

que de allí se deriven son confiables de acuerdo a los parámetros evaluados de la validación.

Se evaluaron 51 muestras de leche líquida que se comercializa en la ciudad de Bogotá, las muestras provienen de diferentes productores así como de diferentes marcas indiscriminadamente. Existen alrededor de 63 marcas de leches líquidas distribuidas en Bogotá de diferentes clases (entre pasteurizada, UHT/UAT y deslactosada); tal y como se observa en la Tabla No. 5 y se visualiza en la Figura No. 16. El universo poblacional de las muestras analizadas en este estudio abarcó el 81% de las marcas distribuidas de leche en Bogotá y el 94% de las productoras de leche líquida. Para el análisis en el Laboratorio de Toxicología las muestras fueron identificadas como ID Muestra y su identidad no fue conocida por parte del investigador. Se realizó duplicado de todas las muestras analizadas. La muestra número uno fue identificada como ID Muestra 1C. El número 1 corresponde a la primera réplica y la C corresponde a Comercializada. El -2 corresponde a la réplica dos o al duplicado de la muestra. Se realizó un muestreo consecutivo el cual intenta incluir a todos los sujetos accesibles como parte de la muestra durante el periodo evaluado, al tratarse de un muestreo no probabilístico puede ser considerada la mejor muestra no probabilística; ya que incluye a todos los sujetos que están disponibles, como fue el caso de las leches comercializadas durante el estudio, haciendo que la muestra representara mejor a toda la población.

Siguiendo los decretos 616 de 2006 de la Presidencia de la República y el decreto 1880 de 2011 de la Presidencia de la República de Colombia los niveles no establecidos a nivel nacional se deben regir por normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del Codex Alimentarius (FAO-OMS). En Colombia la presencia de metales en la leche de acuerdo a la resolución 4506 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia establece los niveles máximos de contaminantes en alimentos destinados al consumo humano, el cual norma un nivel máximo de contenido de 0,02 mg/kg para Pb y no establece niveles para Cd en este producto alimenticio. Cabe mencionar que el Cd no está normado bajo esta resolución al igual que tampoco está normado bajo el Codex Alimentarius, evidenciando un vacío normativo a nivel nacional e internacional; teniendo en cuenta que existen niveles de riesgo de consumo de este contaminante en la leche que deben ser establecidos por cada país de acuerdo al consumo de este alimento y sus posibles fuentes de contaminación para este metal.

Las muestras analizadas contenían niveles de Cd entre 13,9 y 19,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se encontraron tres muestras con niveles de Cd. El 6 % de las muestras analizadas contienen niveles de Cd. Al no encontrarse normado los niveles máximos de contenido de Cd en la leche tanto a nivel nacional como internacional podemos concluir que los niveles detectables encontrados en la población que contenía Cd varían del 13,8 a 19,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,014 a 0,020 mg/Kg). El 94 % de las muestras están libre de Cd o tienen niveles no detectables de Cd de acuerdo a la metodología aplicada. Los niveles encontrados de Pb para las muestras estudiadas se encuentran en el rango de 6,08 a 17,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,0060 a 0,017 mg/Kg). Se encontraron 7 muestras correspondientes a un 14% de las muestras analizadas con contenidos de Pb por debajo de la reglamentación nacional; por

lo tanto no exceden los límites máximos de contenido de Pb de acuerdo a la Resolución 4506 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia determinado del 0,020 mg/Kg.

Es evidente que durante el proceso de obtención, almacenamiento y comercialización, la leche y principalmente la leche cruda puede estar expuesta a peligros químicos tales como residuos de plaguicidas, medicamentos veterinarios, metales y otros contaminantes ambientales, debido a factores que afectan directamente al animal o por factores externos; sin embargo, estos factores son controlados de acuerdo a las buenas prácticas agrícolas, la tecnología y es mitigado de acuerdo a la magnitud de la empresa productora (*Acosta N.M, 2011, Valderrama P.A., 2003*). La calidad higiénica y composicional de la leche influye directamente en el procesamiento de la leche. La calidad higiénica, sanitaria y composicional de la leche está directamente relacionada con el contenido de microorganismos, la salud de la glándula mamaria y a la presencia de residuos químicos y medicamentos (*Acosta N.M, 2011*). No se cuenta aún con información científica acerca de los niveles de residuos en la leche. Por lo cual hace de este estudio, pionero en la construcción para una base de este tipo de contaminantes metálicos en este producto altamente consumido en la canasta familiar.

Para evaluar las posibles causas o factores que pueden influir en la obtención de este tipo de metales en la leche podemos evaluar inicialmente los proveedores de insumos los cuales son el eslabón que suministra todos los productos y servicios necesarios para la manutención, reproducción, sanidad y manejo de los animales, así como el mantenimiento de los potreros y la obtención de leche y sus derivados. Aquí se proveen insumos agropecuarios y almacenes de productos agropecuarios, que proveen a las fincas de semillas, fertilizantes, herbicidas y fungicidas, alimentos para animales y sales mineralizadas, medicamentos y biológicos veterinarios, maquinaria y equipos (*Acosta N.M, 2011; Valderrama P.A., 2003*). En Colombia este proceso va ligado al cumplimiento de normas como las Buenas Prácticas Ganaderas y Agrícolas exigiendo demanda y suministro de mejores insumos agropecuarios así como el mejor uso de los mismos, sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos esta puede ser una posible fuente de contaminación de la leche por metales, principalmente en fertilizantes que contengan Cd en ciertos niveles y eventualmente también a la maquinaria y equipos con algún contenido de metales (*Acosta N.M, 2011; Valderrama P.A., 2003*).

Por otro lado, el eslabón de sistemas productivos donde se desarrollan las actividades por el ganadero a nivel de unidad productiva o finca para la producción de leche el cual en cierta manera puede tener deficiencias en infraestructura para cumplir con los requisitos de diseño sanitario, sistemas de producción sin los debidos controles de proceso, la baja implementación de buenas prácticas de manufactura y del sistema HACCP, sistemas de inocuidad básicos en estos sistemas productivos, deficiencias en los sistemas de almacenamiento de frío, y el acceso y disponibilidad de laboratorios para el control de calidad de los productos, además de las limitaciones tecnológicas en el manejo de residuos. Estas deficiencias son mayormente evidentes en las empresas medianas, pequeñas y artesanales dedicadas al procesamiento de la leche y sus

derivados (*Acosta N.M, 2011; Valderrama P.A., 2003*). La procedencia de la leche tiene el soporte de controles e inscripciones de los hatos ante entidades de control como el ICA.

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencia que en Bogotá la leche procesada que se comercializa cumple con los estándares de calidad (por lo menos ante el cumplimiento de la presencia de los metales de este estudio) y cuentan con el soporte de una marca y registro sanitario; esto es debido a que sus instalaciones de procesamiento son constantemente auditadas e inspeccionadas por organismos como ICA e INVIMA así como su calidad microbiológica y algunos de sus parámetros fisicoquímicos son evaluados por la Secretaria de Salud Distrital de Bogotá. Adicionalmente podemos mencionar que de acuerdo a la aproximación de riesgo toxicológico realizada, es evidente el escaso riesgo toxicológico por consumo de la leche que se está comercializando en la ciudad de Bogotá, debido a la poca probabilidad de que un habitante consuma más de diez vasos diarios de la misma leche (en este caso con niveles de metales, aun así permitidos de acuerdo a la normatividad nacional) y adicional que este consumo sea constante a lo largo de un buen periodo de tiempo. Cabe aclarar que existen diferentes factores que deben ser preferencialmente evaluados con un muestreo de mayor abarque tanto de tiempo como de muestras y en lo posible estimados bajo un monitoreo constante y estricto.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

Se validó la metodología para determinar el contenido de Cd y Pb en matriz leche líquida.

El método validado para el análisis de Cd y Pb en muestras de leche líquida es el siguiente:

Espectrofotometría de Absorción Atómica por horno de grafito
Peso de muestra: aproximadamente 1.0000g
Tiempo de medida: 4.0 s
Longitud de Onda: 228,8 nm para Cd con corrección de lámpara de deuterio
Longitud de Onda: 283.3. nm para Pb con corrección de lámpara de deuterio
Corriente Lámpara: 75%
Rendija: 0.5 nm
Tipo de cubeta: de Grafito recubierta pirrolítica

La gráfica de residuales nos muestra aleatoriedad, se evidencia homogeneidad en todos los datos de las curvas de calibración indicándonos la linealidad del sistema y del método, adicionalmente en ambos casos se obtiene un coeficiente de correlación mayor a 0.995 para ambos metales.

El rango lineal para ambos metales estudiados esta entre 0,2 y 2,5 ug/L.

LD de 0,00035 mg/Kg y un LC de 0,0012 mg/Kg para Cd y un LD de 0,00047 mg/Kg y un LC de 0,0016 mg/Kg para el caso del Pb.

Se demostró que el método para la determinación de Cd y Pb es selectivo, preciso y exacto.

La exactitud cómo % de recuperación del método satisface los criterios de aceptación (80-110%)

Se demostró que El Laboratorio de Toxicología del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional cuenta con los medios físicos y analíticos para emplear esta metodología; lo cual fue demostrado bajo los parámetros analíticos de validación empleados en este trabajo.

Se determinaron los niveles de Cd y Pb en muestras de leche líquida comercializada en la ciudad de Bogotá, abarcando un 81% del total de las marcas distribuidas a nivel local y un 94% de las procesadoras de leche.

Se encontró en las muestras analizadas niveles de Cd entre 13,86 y 19,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,014 y 0,019 mg/kg). El 6 % de las muestras analizadas contienen niveles de Cd.

Los niveles encontrados de Pb para las muestras estudiadas se encuentran con un contenido de Pb en el rango de 6,08 a 17,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,0061 y 0,017 mg/kg). El 14 % de las muestras analizadas contenían niveles de Pb; sin exceder los niveles normados.

De acuerdo a la ISTP se evidencio que no existe riesgo toxicológico por el consumo de leche distribuida en la ciudad de Bogotá D.C.

El riesgo por ingesta de leche con contaminantes de Pb y Cd es mínimo con respecto a la ciudad de Bogotá, la leche es procesada bajo estándares de calidad y de limpieza Sanitaria bajo soporte de una marca y registro sanitario constantemente inspeccionadas por Organismos Gubernamentales.

Este estudio al ser uno de los primeros a nivel nacional en este campo sugiere realizar estudios más profundos, extensos y concluyentes con un muestreo más representativo y con mayor rigor para evaluar si existe riesgo por contaminación por metales en la leche comercializada.

7.2. Recomendaciones

Se sugiere continuar con la línea de alimentos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina, con el fin de abarcar alimentos que repercutan directamente la salud de la población Bogotana y/o población Nacional.

Se recomienda validar la metodología para la determinación de otros metales o metaloides en la misma matriz con el fin de explorar posibles fuentes de contaminación ambiental; tales como Hg, As, Sn entre otros.

Se recomienda validar una metodología para la determinación de metales o metaloides en otras matrices tales como arroz, cereales o chocolate con el fin de explorar posibles alimentos expuestos a los diferentes tóxicos metálicos y observar su relevancia toxicológica.

Se recomienda realizar un muestreo más amplio en el alimento estudiado; que abarque diferentes tipos de leches, con mayor cantidad de muestras, que pueda ser sectorizado y que sea en un tiempo de muestreo mayor, así comparar la mismas marcas de leches con diferentes lotes de producción con el fin de evaluar el riesgo de exposición por metales en este alimento.

Se recomienda realizar un estudio que abarque un muestreo y/o monitoreo de las higienizadoras o enfriadoras de leche a nivel Bogotá con el fin de determinar los metales en estudio y/o otros metales en leche cruda y así comparar los niveles de metales de leches comercializadas Vs leches crudas.

Se recomienda realizar un estudio con muestras de leches en polvo con el fin de comparar el aporte de metales del recipiente vs leche líquidas.

Bibliografía

Abril N., Bárcena J.A., Fernández E., Galván A., Jorrín J., Peinado J. et. al. (2010) Espectrofotometría: *Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de Biomoléculas*. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina, Córdoba, España.

Acosta N.M., Castilla Y., Cortes M., et. al. (2011). *Identificación de riesgos químicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia*. Ministerio de salud y Protección Social., Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA. Instituto Nacional de Salud INS

AOAC Official Method 973.35 (2010) Lead in Evaporated Milk Atomic Absorption Spectrophotometric Method

AOAC Official Method 999.10. (2010). Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion.

Arroyave C.L., Gallego H., Téllez J., (2008). Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas. Ministerio de la Protección Social. Imprenta Nacional de Colombia. p 260-63.

Ataro A., McCrindle R.I., Botha B.M. et. al. (2008). Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry* 111: 243–248

ATSDR (2008). Draft Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services.

ATSDR (2007). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Resumen de Salud Publica Plomo, CAS # 7439-92-1; 2007).

ATSDR, (1999) (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Resumen de Salud Publica Cadmio, CAS # 1306-19-0; 1999)

Bilandžić N., Đović M., Sedak M., et. al. (2011). Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia. *Food Chemistry* 127: 63–66

Carvajal S., Rodriguez D., Peñuela G., (2012) Determinación de los niveles de cadmio en leches crudas usando un biosensor amperométrico. *Revista Lasallista de Investigación* - Vol. 9 No. 1

Conpes 3576. Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia Departamento Nacional de Planeación. Producción, consumo, importaciones y exportaciones de leche y sus derivados

Córdoba D. (2006). Plomo. En Córdoba D & Henao S. Toxicología. (pp 340-344). Editorial Manual Moderno.

Enb A., Donia M.A.A., Abd-Rabou N., et. al. (2009). Chemical composition of raw milk and heavy metals behavior during processing of milk products. *Global Vet.* 3:268-75

Eurachem Guide. (2014) The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second Edition.

García J, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. (2010). Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International* 36:623–636.

García E.J.; Montenegro O; Rubiano J.A; et al. Corpoica. Determinación de los niveles de contaminación por metales pesados tóxicos en los principales sub-sistemas de producción de la planicie aluvial baja del Rio Bogotá. (pp 49-60) Memorias resultados de Investigación.

Gemma, P.; Roser, M.; Domingo, J. (2008) Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (23), 11262 – 11269.

González-Montaña J.R. (2009). Metales pesados en carne y leche y certificación para la Unión Europea (UE). *Rev Colomb Cienc Pecu* 22:3.

IARC (1993a). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Working Group views and expert opinions, Lyon, 9–16 February 1993. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 58: 1–415. PMID:8022054

IARC (1993b). Cadmium and cadmium compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 58: 119–237. PMID:8022055

ILA. International Lead Association. (2013). Recuperado el 10 de Agosto de 2014. Disponible en: <http://www.ila-lead.org/>

International Cadmium Association (2011). Recuperado el 10 de Agosto de 2014. Disponible en: <http://www.cadmium.org>

International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use. (1994) ICH Harmonised tripartite guideline. Text validation of analytical procedures. Recommended for adoption at step 4 of the ICH process on 27 october 1994 by the the ICH Steering Committee.

ISO/NTC 9000:2005. Sistemas de Gestión de la Calidad - Fundamentos y Vocabulario

Jorhem L., Engman J. (2000) Determination of Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Microwave Digestion: NMKL1 Collaborative Study.. *Journal of AOAC international* 83 (5): 1189 – 1203

Kastenmayer P. (1995) Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición (pp 271-294). Depósito de Documentos de la FAO, Departamento de Agricultura.

Kazi T.G., Jalbani N., Baig J.A., et. al. (2009). Assessment of toxic metals in raw and processed milk samples using electrothermal atomic absorption spectrophotometer. *Food and Chemical Toxicology* 47(9):2163-9.

Kido T., Shaikh Z.A., Kito H., et. al. (1991). Dose–response relationship between urinary cadmium and metallothionein in a Japanese population environmentally exposed to cadmium. *Toxicology* 65: 325–32.

Koh T.S., and Benson T.H., (1983) *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 66,918

Lars Järup. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182

Licataa P., Trombettab D., Cristanib M., et. al. (2004). Levels of “toxic” and “essential” metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International* 30: 1 – 6

Lora R.; Bonilla H.; (2010) Remediación de un suelo de la cuenca alta del río Bogotá contaminado con los metales pesados cadmio y cromo. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 13 (2): 61-70

MADR/CCI. (2009) Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural/Cooperación Colombiana Internacional. Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA).

Martínez, G.; Palacio, C. (2010) Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y granos de cacao frescos y fermentados, mediante espectroscopia de absorción atómica de llama. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Bucaramanga, Colombia.

Maas S., Gimbert F., Lucot E. et.al. (2010). Trace metals in raw cows' milk and assessment of transfer to Comté cheese. *Food Chemistry*. 129 (1): 7-12

Miranda D.; Carranza C.; Rojas C.A., et al. (2008) *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* Vol. 2 - No.2 - pp. 180-191

Mounicou, S.; Szpunar, J. (2003) Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additive. Contaminants*. 20(4), 343 – 356.

Nordberg G. Metales: propiedades químicas y toxicidad. (1998). En Stellman J. Cuarta Edición. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo. Madrid, España: Editorial del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales; (Vol 2) p. 63.1-63.75.

Nardi E.P.; Evangelista F.S. Tormen L. et. al. (2009) *Food Chemistry*, 112 727–732

Nordberg G.F., Fowler.B.A., Nordberg M. (2007). Inhalation Handbook on the toxicology of metals. 3rd Edition, San Diego, California. Academic Press Inc. pp 445-80

Nordberg G.F., Fowler.B.A., Nordberg M. (2007). Inhalation Handbook on the toxicology of metals. 3rd Edition, San Diego, California. Academic Press Inc. pp 599-630

Oleru U.G. (1976). Kidney, liver, hair and lungs as indicators of Cd absorption. *Am Ind Hyg Assoc J* 37: 617-30.

Pereira J.S.F., Pereira L.S.F, Schmidt L., et. el. (2013). Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion. *Microchemical Journal* 109: 29–35

Queirolo E, Ettinger A, Stoltzfus R, Kordas K. (2010). Association of Anemia, Child and Family Characteristics With Elevated Blood Lead Concentrations in Preschool Children From Montevideo, Uruguay. *Archives of Environmental & Occupational Health*, Vol. 65, No. 2.

Rahimi E., (2013). Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran. *Food Chemistry* 136: 389–391

Ramírez A. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *Anales de la Facultad de Medicina* 66: 57-70.

Ramírez A. (2006). Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de la Facultad de Medicina* 67: 49-58.

Ramírez A.. (2002) Toxicología del Cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina* Vol. 63, N° 1.

Rey-Crespo F., Miranda M, López-Alonso M., (2013). Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. *Food and Chemical Toxicology* 55: 513–518

Rocha C.E.; *Principios Básicos de Espectroscopía*; (2000) Editorial UACH, (pp 123-203) México,.

Rodríguez H.R., Alejo E.S., Sánchez M.R., et. al. (2005) Metales pesados en leche cruda de bovino. *Salus cum propositum vitae*. 6 (4) Recuperado el 2013/06/11 Del sitio web: <http://www.respyn.uanl.mx/vi/4/articulos/metales.html>.

Sebahat, T.; Polat, A. (2007) Murat. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, cooper, cadmium and lead in children. *Indian j. Pediatrics.*, 74, 827- 830.

Shibamoto T., Bjeldanes L.E. (1993) Introduction to food toxicology. (pp 21-26) San Diego, California, USA. Academic Press Inc.

Shibamoto T., Bjeldanes L.E. (1993) Introduction to food toxicology. (pp 100- 102) San Diego, California, USA. Academic Press Inc.

Shibamoto T., Bjeldanes L.E. (1993) Introduction to food toxicology. (pp 94- 96) San Diego, California, USA. Academic Press Inc.

Shuman, K.; Elsenhans, B. (2002) The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Trace Elem. Med. Bio.*, 16, 139 - 144.

Skoog D.A.; Holler F.J.; Nieman T.A. (2001) Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. McGrawHill. (pp 219-223). Interamericana de España, S.A. U.

Skoog D.A.; Holler F.J.; Nieman T.A. (2001) Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. McGrawHill. (pp 230-237). Interamericana de España, S.A. U.

Skoog D.A.; Holler F.J.; Nieman T.A. (2001) Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. McGrawHill. (pp 340-347). Interamericana de España, S.A. U.

Soares V.A., Kus M.M.M., Peixoto A.L.C., et al. (2010) Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraiba region (Brazil). *Food Control* 21:45–49

Soisungwan S.; Haswel E.; Moore M. (2000) Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *British J. Nutri.*, 84, 791 – 802

Soto C.; Gutierrez S.; Rey-Leon A.; et al. (2010) Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Publicación Científica en Ciencias Biomedicas* Vol 8 No 14, 195-205

Tripathi R.M. Raghunath R., Sastry V.N. (1999) Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *The Science of the Total Environment* 227: 229-235

UNE-EN-14084: 2003. Norma Española. Productos Alimenticios. Determinación de plomo, cadmio, cinc, cobre y hierro mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) tras digestión en microondas

UNEP (2008). *Interim Review of Scientific Information on Cadmium*. Geneva: United Nations Environment Program

USGS (2008). Mineral Commodity Summaries, Cadmium. pp. 42–43.

Valderrama P. A.; Téllez G., (2003) Microcuenca Lechera Valles de Ubaté y Chiquinquirá; Caracterización y Mercadeo de la Leche. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Veterinaria y Zootecnia, Bogotá D.C., Colombia.

Valdivia Melinda M. (2005) Intoxicación por plomo. *Rev. Soc. Per. Med. Inter.* 18(1)

Vandecasteele, C, Block, C.B., (1993) In Modern Methods for Trace Element Determination, (pp.138- 167). Wiley & Sons, Chichester.

Vuori R., Huunan-Seppala A., Kilpio J.O., et al. (1979) Biologically active metals in human tissues: II. The effect of age on the concentration of Cd in aorta, heart, kidney, liver, lung, pancreas and skeletal muscle. *Scand J Work Environ Health* 5: 16-48.

A. Anexo: Acta de Aprobación de Comité de Ética



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

CE - 004
ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 023-14
Fecha: 27 de marzo de 2014

Nombre completo del proyecto "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOMO Y CADMIO EN LECHE PROCESADA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ, D.C.".

Versión número: 01

Sometido por: el estudiante Carlos Giovanni Pinzón Choque

Presentado por: el profesor Jairo Alfonso Téllez Mosquera, Coordinador Académico

Departamento o Sección: Maestría en Toxicología de la Facultad de Medicina.

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 27 de marzo de 2014

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

- | | | |
|---|--------------------------------|---|
| 1 | Amador Luis Roberto | Departamento de Patología |
| 2 | Arteaga Díaz Clara Eugenia | Departamento de Obstetricia y Ginecología |
| 3 | Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Departamento de Ciencias Fisiológicas |
| 4 | Parra Pineda Mario Orlando | Departamento de Obstetricia y Ginecología |

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- a. Es válido desde el punto de vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan
- Eib./ Jeannette P. AL.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

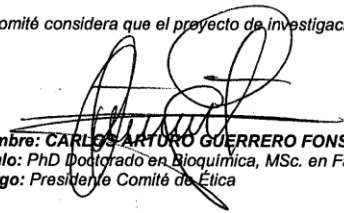
6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética, de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

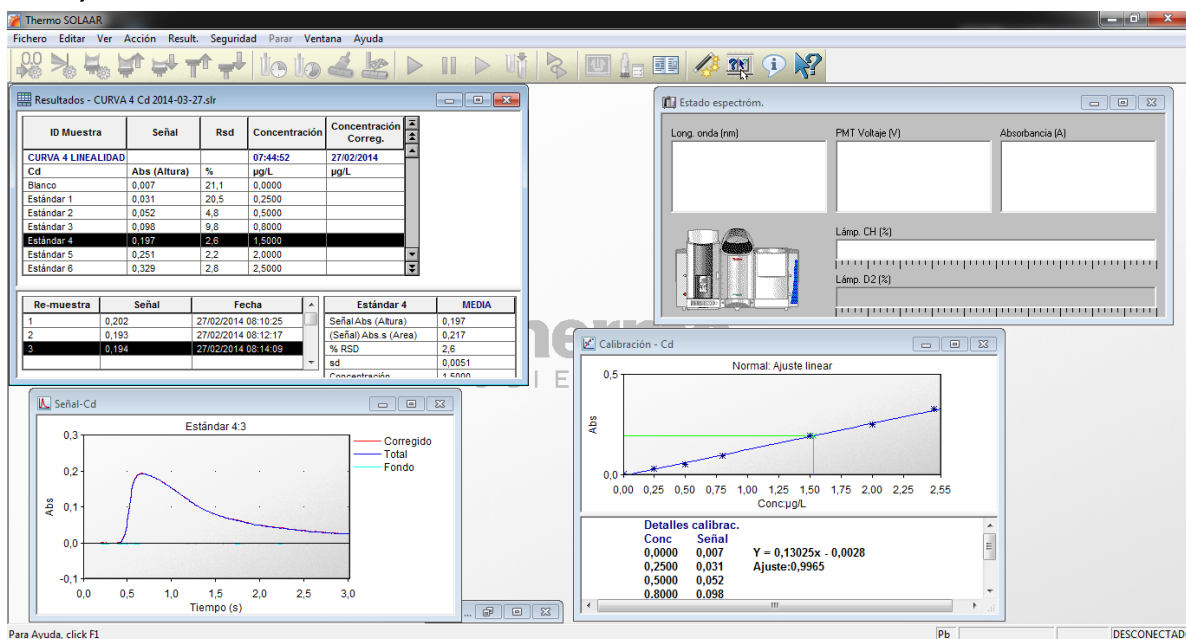
8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

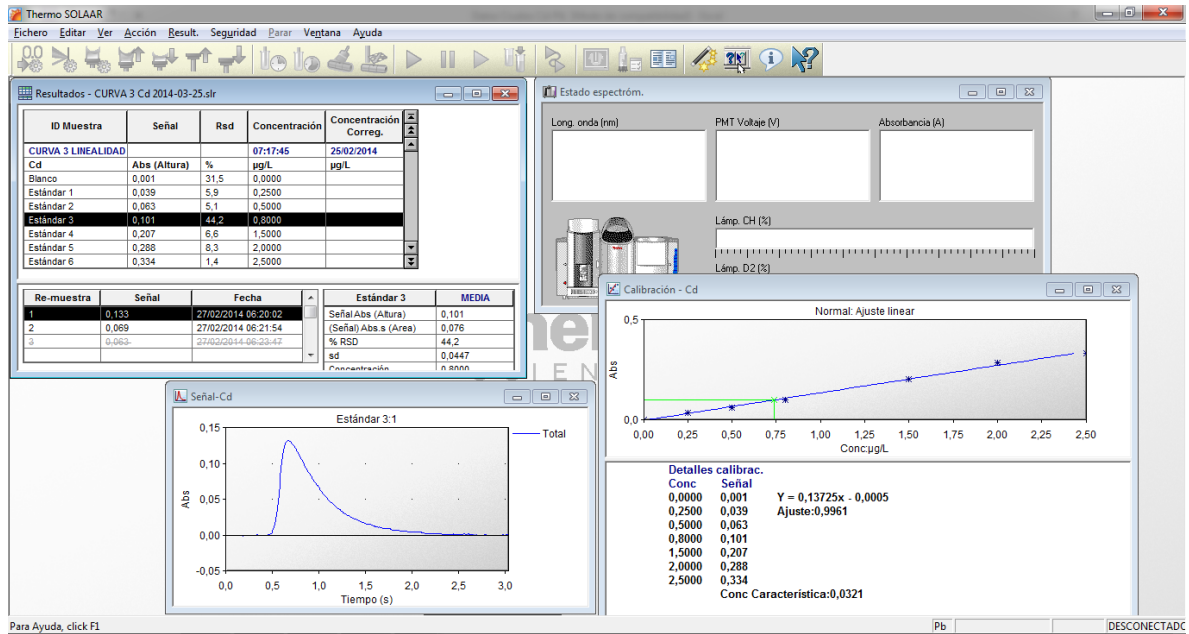
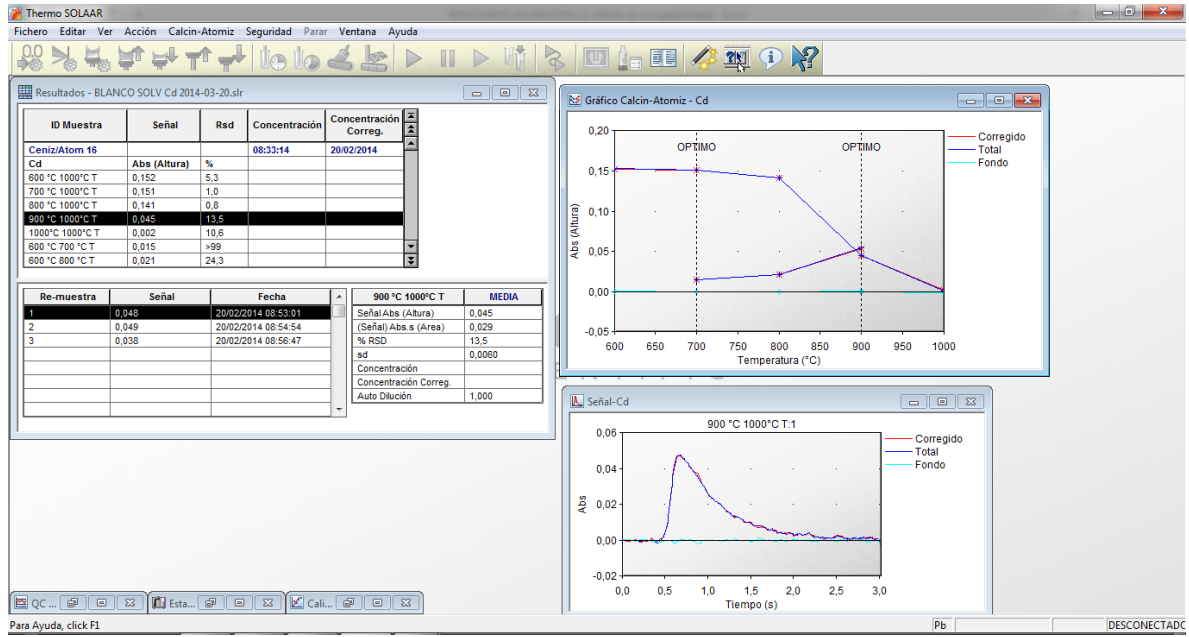

Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana
Cargo: Presidente Comité de Ética

Elb/ Jeannette P. Al-

B. Anexo: Imágenes de optimización y curvas (Screen software Solar equipo AA)



Optimización del método



C. Anexo: Guía operativa del espectrofotómetro de Absorción Atómica Thermo Elemental Solaar iCE 3400

1. OBJETIVO

Este procedimiento describe los pasos a seguir para el manejo del equipo de absorción atómica y define su alcance de aplicación en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina – Universidad Nacional de Colombia.

2. RIESGOS Y CONTROL DE RIESGOS

Riesgos	Control de riesgos
<p>Radiaciones UV. Las lámparas de cátodo hueco y lámpara de deuterio para corrección de background para uso en absorción atómica, espectrometría UV producen radiación UV Desprendimiento de vapores irritantes y corrosivos.</p> <p>Quemaduras químicas en la manipulación de ácidos concentrados empleados en el tratamiento previo (digestión) de las muestras a analizar.</p> <p>Quemaduras térmicas con la llama, horno de grafito y zonas calientes en general.</p> <p>Fugas de gases: acetileno y otros.</p> <p>Posible formación de hidrógeno cuando se utiliza el sistema de generación de hidruros.</p>	<p>Conserve siempre las normas de seguridad y las buenas prácticas en el laboratorio para operar los equipos. Utilizar guantes, gafas y equipos de protección personal adecuados.</p> <p>Realizar las digestiones ácidas en cabina de extracción.</p> <p>Encender el sistema de extracción de la unidad de llama u horno de grafito.</p> <p>Buena ventilación general cuando se trabaja con el generador de hidruros.</p> <p>Tomar las precauciones adecuadas para trabajar con acetileno.</p> <p>No mirar directamente a la llama ni a las fuentes de emisión (lámparas).</p> <p>Evacue regularmente el recipiente de residuos. No acumule residuos en el recipiente de drenaje.</p> <p>Verifique regularmente las presiones de los gases. Recuerde que el cilindro de acetileno se encuentra estabilizado con acetona y no se debe operar por debajo de 100 PSI. Después de cambiar el cilindro de acetileno, chequee las conexiones con solución de jabón.</p> <p>Las muestras deben estar libres de sedimentos o precipitados que puedan obstruir las líneas del equipo, si es necesario se</p>

	<p>deben filtrar.</p> <p>Nunca exponga sin protección los ojos a la luz UV desde una fuente directa o reflejada. Use protección adecuada para los ojos tales como gafas que tengan lentes de óxido de uranio, etc. Evite exponer la piel a la radiación UV el mínimo tiempo posible.</p>
--	--

3. DESCRIPCION DEL EQUIPO

El equipo de absorción atómica está conformado por los siguientes módulos:

- + Espectrofotómetro AA iCE Series 3000
- + Automuestreador CETAC
- + Generador de hidruros
- + Horno de Grafito
- + Chiller
- + Computador HP, con software Thermo SOLAAR.
- + Compresor
- + Automuestreador para horno de grafito GFS

4. PROCEDIMIENTO

Se debe seleccionar de acuerdo al tipo de metal y a la concentración a evaluar el modo de operación del equipo: horno de grafito, llama y generador de hidruros.

4.1. Operación en el modo de llama

4.1.1. Operación del espectrofotómetro

Encendido

- + Encienda el extractor de gases ubicado sobre el quemador del espectrofotómetro.
- + Verifique el paso y presión del gas.

Mezcla de gases	Presión de trabajo	Punto de control
Acetileno	9-12 p.s.i.	C ₂ H ₂ : P _{mc} ≥100 p.s.i.
Aire	Compresor: 30 p.s.i.	
Acetileno	9-12 p.s.i.	C₂H₂: P_{mc} ≥100 p.s.i.
Óxido nitroso	40 libras	Regulador termostatado a la salida del cilindro

Pmc = Presión mínima del cilindro

Nota: Encienda el compresor para trabajo con aire.

- ✦ Verifique la conexión de la manguera al recipiente de drenaje.
- ✦ Encienda el espectrofotómetro y el computador.
- ✦ Coloque la lámpara de cátodo hueco del metal a leer en el carrusel de lámparas.

4.1.2. Operación del software del Espectrofotómetro de absorción atómica (EAA)

- ✦ Selección del software de control del espectrofotómetro: Para abrir el programa que controla el instrumento, dar doble clic izquierdo (con el mouse) en el icono de acceso directo SOLAAR. Colocar el nombre del operador y seleccione OK. Cerrar la pantalla del asistente.
- ✦ Para guardar los resultados que se van a obtener, dar click izquierdo (con el mouse) en “fichero”, seleccionar con click izquierdo “Abrir resultados”, escoger el archivo en el cual se van a grabar los datos. Dar click en Abrir.
- ✦ Para seleccionar un método de trabajo, dar click izquierdo (con el mouse) en el icono “mostrar métodos”. En la pestaña superior “General” dar click izquierdo en “Librería”, escoger el método que se desea trabajar dando click izquierdo en “cargar”.
- ✦ Para verificar las condiciones del método, continuar así:
- ✦ En la pestaña “General”: Se encuentran las condiciones generales.
- ✦ En la pestaña “Secuencia”: Ingresar los códigos numéricos de la secuencia los blancos, QC y las muestras que se van a analizar.
- ✦ En la pestaña “Espectrómetro” se encuentran las condiciones: Modo de medida, re-muestras, tiempo de medida, corrección de fondo, longitud de onda, % de corriente aplicado a la lámpara, señal, libro de cocina (en este se encuentra descrito las condiciones óptimas de trabajo para llama, horno y generador).
- ✦ En la pestaña “Llama” se encuentra: Tipo de medida, flujo de combustible, estabilización (tiempo de estabilización del mechero (min), tiempo toma nebulizador (s)) y altura del mechero.
- ✦ En la pestaña “Calibración” se encuentran: método, unidades de concentración, estándares, concentraciones estándar, ajuste aceptable.
- ✦ En la pestaña “Muestreo” se encuentran: CETAC, frecuencia de lavado, tiempo de lavado.

- ✚ En la pestaña “QC” se encuentran las condiciones para realizar el control de calidad interno del método.
- ✚ Para grabar el método regrese a la pestaña “General” y seleccione el comando “guardar”, ubicado en la parte inferior izquierda, grabe los cambios escogiendo “SI”, seguido de “aceptar”.

4.1.3. Operación con llama

Una vez verificadas las condiciones del numeral 4.1.1 y 4.1.2, verifique la alineación del quemador y proceda a prender la llama del equipo manteniendo oprimido el botón de llama.

Optimización del equipo

Una vez tenga listo el método a utilizar de click en el ícono “Configuración óptica”.

Análisis de muestras

Seleccione el ícono “ANALIZAR”, registre: nombre del análisis, operador y notas de análisis. Confirme con “analizar”.

Análisis de resultados

- ✚ Curvas de calibración: El coeficiente de correlación de las curvas de calibración no debe ser menor de 0.995.
- ✚ Muestras: Los resultados en color rojo indican que las muestras se encuentran fuera del rango de trabajo. Realice las diluciones cuando sea necesario.

4.2. Operación en el modo de generador de hidruros VP90

Conexión entre el generador y el espectrofotómetro

Verifique que el generador de hidruros VP90 se encuentra conectado por el cable ubicado en la parte de atrás al lado de la celda del generador.

Corriente de gas

Regule el flujo en el generador mediante la perilla del flujómetro a un flujo de 150 a 200 ml/minuto.

Operación del generador

- ✚ Prepare los reactivos de trabajo del generador (HCl y Borohidruro de sodio) e instale las botellas, la línea verde es para ácido y la línea roja para el borohidruro.

- ✚ Prenda la bomba peristáltica del generador e Instale las caseteras para cada una de las líneas. Observe la producción de burbujas en la celda de reacción.
- ✚ Coloque el portaceldas en el quemador del espectrofotómetro y coloque la celda de cuarzo en el portaceldas e instale la manguera para sostener la celda (esta manguera debe estar conectada a la salida de la celda del generador de hidruros).
- ✚ Verifique que la luz de la lámpara atraviese la celda del cuarzo.
- ✚ Optimice la alineación de la celda.
- ✚ Programe de forma manual el tiempo de estabilización, el tiempo de línea base y de medición.
- ✚ Seleccione en el Generador de hidruros la tecla AUTO para enlazar el generador con el PC.

4.2.1. Operación del espectrofotómetro

Desde el PC seleccione el método de análisis como se indicó en 4.1.1. Realice la optimización del espectrofotómetro como se describe en el numeral 4.1.2., optimización del equipo. Proceda a realizar el análisis de muestras y el análisis de resultados.

4.3. Operación del Horno de grafito GFS

Encendido del equipo

- ✚ Encienda el extractor de gases ubicado sobre el quemador del espectrofotómetro y el horno de grafito.
- ✚ Encienda el chiller del equipo y verifique su contenido de agua. La temperatura debe encontrarse cinco (5° C) grados centígrados (5° C) por debajo de la temperatura ambiente.
- ✚ Coloque corriente de argón a una presión de 17 libras.
- ✚ Instale la cubeta en el horno. Utilice la regleta para verificar que se encuentra bien instalada.
- ✚ Verifique que el automuestreador tenga disponible el frasco con solución de lavado y que el frasco de desechos se encuentre disponible para su uso.
- ✚ Purgue la jeringa del automuestreador FS95: Retire la jeringa del automuestreador y retire el embolo. Desde el PC y con el método cargado para trabajar con horno de grafito, vaya a “ACCIÓN” y de click en “AUTOMUESTREADOR” y luego en “PURGAR”. Esta operación debe durar aproximadamente tres minutos. Una vez terminada instale nuevamente el embolo y la jeringa.

- ✚ Alinee la sonda dentro del puerto de inyección: Desde el PC y con el método cargado para trabajar con horno de grafito. Vaya a “ACCIÓN” y de click en “AUTOMUESTREADOR” y luego en “ALINEAR SONDA”. Verifique con la ayuda del espejo que la sonda se encuentra bien instalada. Utilice las perillas de ajuste ubicados en el automuestreador para alinear el tip. Utilice la cámara Graphite Furnace TeleVision (GFTV) en modo encendido de Análisis de muestras interna del equipo para verificar el correcto alineamiento de la sonda.

Análisis

- ✚ Configuración Óptica desde el PC: Una vez seleccionado el método de click en “CONFIGURACIÓN ÓPTICA”.
- ✚ Retire la tapa que cubre el automuestreador GFS. Cargue el automuestreador en las posiciones grandes con blanco y modificadores de matriz y en los viales pequeños con estándares y muestras. Coloque nuevamente la tapa del automuestreador GFS. *Nota: Revise en el método, que la secuencia el automuestreador corresponda a la secuencia física de muestras.*
- ✚ Limpiar la cubeta: Desde el PC, seleccione “LIMPIAR CUBETA”.
- ✚ Realizar el análisis: De click en “ANALIZAR”, registre: nombre del análisis, operador y notas de análisis. Confirme con “analizar”.

Análisis de resultados

Curvas de calibración: El coeficiente de correlación de las curvas de calibración no debe ser menor de 0.995.

Muestras: Los resultados en color rojo indican que las muestras se encuentran fuera del rango de trabajo. Realice las diluciones cuando sea necesario.

5. MANTENIMIENTO Y LIMPIEZA

El analista debe realizar la limpieza de las todas las partes externas del equipo con un trapo limpio y suave con el fin de retirar suciedad ambiental. El mantenimiento del horno de grafito lo debe realizar el operador con copitos de algodón e isopropanol.

6. REFERENCIAS

SOLAAR Series Software; Manual; 9499 400 30011. Version 2.01. 2011Thermo Fisher Corporation Registration No. 441506

Atomic Absorption Spectrometry. Methods Manual. 9499 400 30011. Issue 5. 2008 Thermo Fisher Corporation Registration No. 441506.

iCE 3000 Series. AA Spectrometers. Operators Manuals. 9499 500 23000 Version 2.0. 2011 Thermo Fisher Scientific.

D. Anexo: Peso de las muestras de leche comercializada analizadas

<i>Muestra</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Muestra</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Muestra</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Fortificados</i>	<i>Peso (g)</i>
1	1,0348	17	1,0349	33	1,0532	49	1,0182
	1,0285		0,9792		1,0524		1,0078
2	1,0122	18	1,0027	34	1,0516	50	1,0053
	1,0123		0,9998		1,0508		1,0001
3	1,0146	19	1,0575	35	1,0699	51	1,0014
	1,0146		1,0587		1,0491		1,0018
4	1,0120	20	1,0193	36	1,0483		
	1,0101		1,0203		1,0497		
5	1,0028	21	1,0024	37	1,0205		
	1,0027		0,9989		1,0163		
6	1,0171	22	1,0006	38	1,0164		
	1,0172		1,0204		1,0127		
7	1,0119	23	1,0101	39	1,0038		
	1,0119		1,0012		0,9988		
8	1,0115	24	1,0058	40	1,2982		
	1,0016		1,0042		1,0978		
9	1,0000	25	1,0032	41	1,0053		
	1,0002		0,9966		1,0001		
10	1,0103	26	1,0141	42	1,0014		
	1,0103		1,0107		1,0018		
11	1,0046	27	1,0250	43	1,0157		
	1,0045		1,0214		1,0115		
12	1,0075	28	1,0462	44	1,0287		
	1,0073		1,0451		1,0218		
13	1,0195	29	1,0223	45	1,0178		
	1,0195		1,0219		1,0131		
14	1,0143	30	1,0851	46	1,0258		
	1,0139		1,0826		1,0186		
15	1,0081	31	1,0023	47	1,0270		
	1,0080		1,0023		1,0196		
16	1,0085	32	1,0885	48	1,0068		
	1,0088		1,0758		0,9997		

E. Anexo: Certificados de estándares de referencia Cd, Pb y material volumétrico, Calificación Operacional del Espectrofotómetro de Absorción Atómica iCE Series 3000; Calibración de la Balanza Analítica Digital Acculab.

125 Market Street
New Haven, CT 06513
USA

AccuStandard, Inc.

Tel (203)786-5290
Fax (203)786-5287
www.AccuStandard.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

AccuTrace™ Reference Standard
Item Number: ICP-29N-10X-1

Element: Lead	Density: 1.030 g/mL
Concentration: 10000 µg/mL	Lot: 213045020
Storage Condition: Ambient	Date Certified: 4/9/2013
Hazards: CORROSIVE	Expiration: Age / 2018
Matrix: 2-5% Nitric acid	Sample Size: 100 mL

Included on ISO/IEC 17025 Scope of Accreditation
 Included on ISO Guide 34 Scope of Accreditation

Elements in µg/mL

Ag nd<0.02	Cr nd<0.02	Ho nd<0.02	Nd nd<0.02	S N/A	Ti nd<0.02
Al nd<0.02	Cs N/A	In nd<0.2	Ni nd<0.02	Sb nd<0.2	Tl nd<0.2
As nd<0.2	Cu nd<0.02	Ir nd<0.2	Os N/A	Se nd<0.02	Tm nd<0.02
Au nd<0.02	Dy nd<0.02	K nd<0.2	P N/A	Sm nd<0.2	U nd<0.2
B nd<0.2	Er nd<0.02	La nd<0.02	Pb *	Si N/A	V nd<0.02
Ba nd<0.02	Eu nd<0.02	Li nd<0.02	Pd nd<0.2	Sn nd<0.2	W nd<0.2
Be nd<0.02	Fe nd<0.02	Lu nd<0.02	Pr nd<0.2	Sr nd<0.02	Y nd<0.02
Bi nd<0.2	Ga nd<0.02	Mg nd<0.02	Pt nd<0.2	Ta nd<0.2	Yb nd<0.02
Ca 0.14	Gd nd<0.02	Mn nd<0.02	Rb N/A	Tb nd<0.02	Zn 0.08
Cd nd<0.02	Ge nd<0.2	Mo nd<0.02	Re nd<0.2	Tc nd<0.2	Zr N/A
Ce nd<0.2	Hf nd<0.02	Na N/A	Rh nd<0.2	Th nd<0.02	
Co nd<0.02	Hg nd<0.2	Nb nd<0.2	Ru nd<0.02		

The gravimetric uncertainty for this product is ±0.24%. The CRM uncertainty is ±5%. See reverse side for details.
 This solution was assayed titrimetrically, using EDTA which was standardized against NIST SRM 492R (lead nitrate).
 The concentration of the final solution was verified by ICP against NIST SRM 3124.


RESULTS: This solution standard was certified for accuracy of major elemental consistency via methodology traceable to primary or well characterized secondary standards. All trace level elements and impurities were determined via plasma emission spectroscopy at the concentration.

This standard was prepared gravimetrically to contain the elemental concentrations shown above. Balances, used in the preparation, are calibrated regularly using NIST-traceable weights. All glassware used in preparation is Class A.

We use the highest purity raw materials available, including high purity acids, ASTM type I 18 megohm deionized water, and typically 99.999%+ starting materials to minimize impurity levels in the final solution. All bottles are acid leached and then triple rinsed with deionized water prior to use.

Use good laboratory procedure when diluting this product. Shake bottle prior to use and do not pipette directly out of the bottle. Use only cleaned Class A volumetric glassware.


We certify the accuracy of this standard to be ±0.5% of the stated value until the expiration date listed above, provided it is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.


 Lydia Snyder
 Inorganic QC Supervisor

For use in routine laboratory analysis.
AccuStandard is accredited to ISO Guide 34, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001

08.00040.00
Rev. 1/11

Estándar Certificado de Plomo

125 Market Street New Haven, CT 06513 USA		 AccuStandard® Inc.		Tel: (203) 795-0290 Fax: (203) 795-0297 www.AccuStandard.com							
CERTIFICATE OF ANALYSIS											
AccuTrace™ Reference Standard											
Item Number: ICP-08N-10X-1											
Element: Cadmium		Density: 1.030 g/mL									
Concentration: 10000 µg/mL		Lot: 211125109									
Storage Condition: Ambient		Date Certified: 12/28/2011									
Hazards: CORROSIVE		Expiration: Dec / 2016									
Matrix: 2-5% Nitric acid		Sample Size: 100 mL									
<input checked="" type="checkbox"/> Included on ISO/IEC 17025 Scope of Accreditation											
<input checked="" type="checkbox"/> Included on ISO Guide 34 Scope of Accreditation											
Elements in µg/mL											
Ag	nd<0.02	Cr	nd<0.02	Ho	nd<0.02	Nd	nd<0.02	S	N/A	Ti	nd<0.02
Al	nd<0.02	Cs	N/A	In	nd<0.2	Ni	nd<0.02	Sb	nd<0.2	Tl	nd<0.2
As	nd<0.2	Cu	0.08	Ir	nd<0.2	Os	N/A	Sc	nd<0.02	Tm	nd<0.02
Au	nd<0.02	Dy	nd<0.02	K	nd<0.2	P	N/A	Se	nd<0.2	U	nd<0.2
B	nd<0.2	Er	nd<0.02	La	nd<0.02	Pb	nd<0.2	Si	nd<0.2	V	nd<0.02
Ba	nd<0.02	Eu	nd<0.02	Li	nd<0.02	Pd	nd<0.2	Sm	nd<0.2	W	N/A
Be	nd<0.02	Fe	nd<0.02	Lu	nd<0.02	Pr	nd<0.2	Sr	nd<0.02	Y	nd<0.02
Bi	nd<0.2	Ga	nd<0.02	Mg	nd<0.02	Pt	nd<0.2	Sr	nd<0.02	Yb	nd<0.02
Ca	0.02	Gd	nd<0.02	Mn	nd<0.02	Rb	N/A	Ta	nd<0.2	Zn	0.1
Cd	*	Ge	nd<0.2	Mo	nd<0.02	Re	N/A	Tb	nd<0.02	Zr	nd<0.02
Ce	nd<0.2	Hf	nd<0.02	Na	0.11	Rh	nd<0.2	Te	N/A		
Co	nd<0.02	Hg	nd<0.2	Nb	nd<0.2	Ru	nd<0.02	Th	nd<0.02		

The gravimetric uncertainty for this product is ±0.24%. The CRM uncertainty is 4.5%. See reverse side for details.
This solution was assayed titrimetrically, using EDTA which was standardized against NIST SRM #928 (lead nitrate).
The concentration of the final solution was verified by ICP against NIST SRM# 3108

RESULTS: This solution standard was certified for accuracy of major elemental constituency via methodology traceable to primary or well characterized secondary standards. All trace level elements and impurities were determined via plasma emission spectroscopy on the concentrate.

This standard was prepared gravimetrically to contain the elemental concentrations shown above. Balances, used in the preparation, are calibrated regularly using NIST-traceable weights. All glassware used in preparation is Class A.

We use the highest purity raw materials available, including high purity acids, ASTM type 1 18 megohm deionized water, and typically 99.999%+ starting materials to minimize impurity levels in the final solution. All bottles are acid leached and then triple rinsed with deionized water prior to use.

Use good laboratory procedure when diluting this product. Shake bottle prior to use and do not pipette directly out of the bottle. Use only cleaned Class A volumetric glassware.



We certify the accuracy of this standard to be ±0.5% of the stated value until the expiration date listed above, provided it is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.


L. Snyder
Lydia Snyder
Inorganic QC Supervisor

For use in routine laboratory analysis.
AccuStandard is accredited to ISO Guide 34, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001

08-010-010-001
Rev. 1/11



Estándar Certificado de Cadmio

Qualitätszertifikat · Certificate of Performance Certificat de qualité · Certificado de calidad	
PLASTIBRAND® Volumenmessgeräte · Volumetric Instruments Appareils de volumétrie · Material volumétrico	
Chargenprüfung · Batch control Contrôle du lot · Control del lote	
<p>Diese Endprüfwerte sind bezogen auf 20°C. Diese Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.</p> <p>These final test values refer to 20°C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (Federal Institute of Physics and Metrology).</p> <p>Ces valeurs finales se réfèrent à 20°C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral de la Physico-Technique Allemand).</p> <p>Estos valores de control final se refieren a 20°C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones de PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).</p>	
	
BRAND GMBH + CO KG Postfach / P.O. Box 1155 97861 Wertheim/Main Germany	
	

Messkolben, Volumetric Flask, Fioles Jaugees, Matracas Aforados	
PLASTIBRAND, PMP, A, NS 12/21	
Best.-Nr. / Cat. No. / Réf. / Ref.:	36174
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal:	50.0 ml
Fehlergrenze/Error limit: Limite d'erreur/Limite de error:	± 0.0600 ml -----
Chargen-Nr./Batch No.: Numéro du lot/Número del lote:	10.04
Mittelwert/Mean value: Valeur moyenne/Valor medio:	49.9771 ml
Standardabweichung/Standard deviation: Ecart type/Desviación standard:	± 0.0129 ml
Prüfmittel · Testing devices Instruments de contrôle · Instrumentos de medición	
Waage/Balance: Balance/Balanza:	300400-25, 220g/0,00001
<p>Die Kalibrierung erfolgt alle drei Monate./The calibration is effected every 3 months./ Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectua cada tres meses</p>	
Gewichte/Weights: Poids/Peso:	800033-1, F1 (2011, DKD11801, Nr.G2-445)
Thermometer/Thermometer: Thermomètre/Termómetro:	351000-3, 0-30°C/0,1°C (2024, EA Werth., Nr.3119)
Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador:	
Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición:	10-Sep-2010

155125 394097

Balón Certificado de 50 mL. Lote 10.04

Qualitätszertifikat · Certificate of Performance Certificat de qualité · Certificado de calidad	
PLASTIBRAND® Volumenmessgeräte · Volumetric Instruments Appareils de volumétrie · Material volumétrico	
Chargenprüfung · Batch control Contrôle du lot · Control del lote	
<p>Diese Endprüfwerle sind bezogen auf 20°C. Diese Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die verwendeten Normale sind an die Normale der PTB angeschlossen.</p> <p>These final test values refer to 20°C. The test was effected according to ISO 4787. The used standards are connected with the standards of the PTB (Federal Institute of Physics and Metrology).</p> <p>Ces valeurs finales se réfèrent à 20°C. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés sont liés aux étalons du PTB (Institut Fédéral de la Physico-Technique Allemand).</p> <p>Estos valores de control final se refieren a 20°C. El control se efectuó de acuerdo con ISO 4787. Los patrones utilizados son ligados a los patrones de PTB (Organismo oficial alemán de calibrado y standards).</p>	
  <p>BRAND GMBH + CO KG Postfach / P.O. Box 1155 97861 Wertheim/Main Germany</p>	
Messkolben, Volumetric Flask, Fioles Jaugees, Matracas Aforados	
PLASTIBRAND, PMP, A, NS 10/19	
Best.-Nr. / Cat. No./ Réf. / Ref.: 36174	
Nennvolumen/Nominal volume: Volume nominal/Volumen nominal: 50.0 ml	
Fehlergrenze/Error limit: ± 0.0600 ml Limite d'erreur/Limite de error: ----	
Chargen-Nr./Batch No.: Numéro du lot/Número del lote: 07.03	
Mittelwert/Mean value: 49.9967 ml Valeur moyenne/Valor medio: Standardabweichung/Standard deviation: Ecart type/Desviación standard: ± 0.0129 ml	
Prüfmittel · Testing devices Instruments de contrôle · Instrumentos de medición	
Waage/Balance: 300400-25, 220g/0,00001 Balance/Balanza:	
<small>Die Kalibrierung erfolgt alle drei Monate./The calibration is effected every 3 months./ Le calibrage est effectué tous les 3 mois./El calibrado se efectua cada tres meses</small>	
Gewichte/Weights: 800033-1, F1 Poids/Peso: (2007, DKD11801, Nr.G1-389)	
Thermometer/Thermometer: 351000-3, 0-30°C/0,1°C Thermomètre/Termómetro: (2008, EA Werth., Nr.3119)	
Prüfer/Operator: Vérificateur/Comprobador: <i>V. Paris</i>	
Ausstellungsdatum/Date of issue: Date de délivrance/Fecha de exposición: 13-Dec-2007	

109713 999994

Balón Certificado de 50 mL Lote 07.03



CERTIFICADO DE CALIFICACIÓN OPERACIONAL

Fecha de Calibración: Octubre 11 de 2013

Certificado No. 120

Empresa: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - laboratorio de Toxicología	Equipo: Espectrofotómetro ICE 3000 Series
Dirección: Carrera 30 Calle 45	Modelo: ICE 3500
Teléfono: 316 50 00	Marca: Thermo Scientific
	Serie: AA051124501

VALORES DE LONGITUD DE ONDA

LONGITUD DE ONDA ENCONTRADA	RANGO PERMITIDO	RESULTADO
285,2	285,0 - 285,4	Pasa
347,2	347,1 - 347,5	Pasa
603,0	602,8 - 603,2	Pasa
743,9	743,7 - 744,1	Pasa

VALORES DE ABSORBANCIA

FILTRO	VALOR MEDIDO	RANGO DE ABSORBANCIA RELATIVA PERMITIDO		RESULTADO
		MIN	MAX	
No. 0	0,002	-0,007	0,007	Pasa
No. 3	0,468	0,4314	0,4954	Pasa
No. 4	0,915	0,8719	0,9559	Pasa
No. 6	1,962	1,8321	2,0801	Pasa

* Absorbancia medida después de hacer Autozero con el filtro No. 0

TEMPERATURA AMBIENTE: 24 °C

INNOVATEK LTDA
Carrera 21 No. 41-26 Bogotá, D.C. PBX: 338 0711 Fax: 3270936
www.innovatek.com.co

Página 1 de 2

Fecha: 02-07-2008
Código: C.ST.AA.0014-02

MÉTODO DE CALIBRACIÓN:

Medición de filtros certificados y localización de líneas espectrales de emisión de las lámparas de cátodo hueco.
Ver Documento Innovatek Código: P.ST.0006, versión vigente.

MATERIAL UTILIZADO:

1. Filtros de densidad neutra P/N 9423 179 38091, serie A921, modificados de 0 a 8, calibrados en Octubre 27 de 2009 con certificado de calibración No. 08095.
2. Lámpara Multielemento Cr/Ni/Mn Unioam P/N 9423 393 31161
3. Lámpara Multielemento Ca/Mg Unioam P/N 9423 393 31011
4. Software Solaar

TRAZABILIDAD:

Los filtros empleados fueron calibrados contra patrones NPL/NIST.

NORMA:

El certificado de calibración No. 08095 fue emitido de acuerdo con los requerimientos de acreditación del United Kingdom Accreditation Service. ISO/IEC 17025.

Cada juego de filtros es exclusivamente identificado y calibrado en el laboratorio de THERMO ELECTRON CORP. No 0521, construido en un ambiente certificado bajo ISO 9001. La calibración de estos filtros es llevada a cabo por un procedimiento acreditado, el cual es auditado por UKAS (United Kingdom Accreditation Service), ofreciendo un respaldo independiente, reconocido internacionalmente por los procesos ISO/IEC 17025.

NOTAS: _____

CONCLUSIÓN

El instrumento trabaja dentro de especificaciones de fábrica y puede ser usado con fiabilidad.

Realizado por:


ING. ADRIAN LAGUNA VALBUENA.
Departamento de Soporte Técnico
e-mail: sopORTE@innovatek.com.co

INNOVATEK LTDA
Carrera 21 No. 41-26 Bogotá, D.C. PBX: 338 0711 Fax: 3270936
www.innovatek.com.co

Página 2 de 2

Fecha: 02-07-2008
Código: C.ST.AA.0014-02

*Certificado de Calificación Operacional del Espectrofotómetro de Absorción Atómica iCE
3000 series*



METROLABOR LTDA.
CERTIFICADO DE CALIBRACION
CALIBRATION CERTIFICATE



NUMERO: MET14-CC 7713
Number:

LABORATORIO: MASA Y BALANZAS
 Laboratory

INSTRUMENTO: BALANZA ANALITICA DIGITAL
 Instrument

FABRICANTE: ACCULAB
 Manufacturer

MODELO: LA-200
 Model

RANGO DE MEDICION: 0,01 g ... 200 g
 Measurement range

NUMERO DE SERIE: 70406868
 Serial Number

CODIGO INTERNO: 252751 - 0127720
 Internal Code

SOLICITANTE: UNIVERSIDA NACIONAL DE COLOMBIA - FACULTAD DE MEDICINA
 Customer

DIRECCION: CARRERA 30 No. 45-03, EDIFICIO 4-71 FACULTAD DE MEDICINA, BOGOTÁ D.C. - COLOMBIA.
 Address

FECHA DE CALIBRACION: 2014-01-28
 Date of Calibration

NUMERO DE PAGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: CUATRO (4)
 Number of pages of this certificate and documents attached

Firmas Autorizadas:
 Authorized Signatures

Ingeniero Mario Andrés Galindo H.
 Calibrado por: Calibrated by

Ingeniero Carlos Alberto Triana R.
 Revisado por: Checked by

Este certificado asegura fielmente el resultado de las mediciones realizadas. No podrá ser reproducido total o parcialmente excepto cuando se haya obtenido permiso por escrito del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados. El usuario es responsable de la recalibración de sus instrumentos a intervalos apropiados.

This certificate is an accurate record of the performed measurements results. This certificate may not be partially or totally reproduced, except with the issuing laboratory. The results of this certificate refer to the moment and conditions in which the measurement were made. The issuing laboratory assumes no responsibility to the misuse of the calibrated instruments. The user is responsible for having his instruments calibrated at appropriate intervals.



METROLABOR LTDA.

CERTIFICADO DE CALIBRACION
CALIBRATION CERTIFICATE



NUMERO: MET14-CC 7713

Number:

INFORME DE CALIBRACION

1. DESCRIPCION DEL INSTRUMENTO

INSTRUMENTO	BALANZA ANALITICA DIGITAL	CARGA MÁXIMA	200	g
FABRICANTE	ACCULAB	CARGA MÍNIMA	0.01	g
MODELO	LA-200	DIVISIÓN DE ESCALA (d)	0.0001	g
SERIE	70406868	ESCALÓN DE VERIFICACIÓN (e)	0.001	g
CÓDIGO INTERNO	252751 - 0127720	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (s)	0.0001	g
FECHA DE CALIBRACION	2014-01-30	DESVIACIÓN LINEAL (ln)	0.0003	g
UBICACION	LABORATORIO TOXICOLOGIA	SITO DE CALIBRACION	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - FACULTAD DE MEDICINA	

1.1 ERRORES MAXIMOS PERMISIBLES

CARGA	VALOR NOMINAL		ERROR MAXIMO TOLERADO EN USO
CARGA BAJA	0.01 g	s m ±	50 g ± 0.001 g
CARGA MEDIA	50 g	< m ±	200 g ± 0.002 g
CARGA ALTA	—	—	—

Falta carga m' expresada en divisiones de verificación 'e'

Nota: estos errores aplican únicamente para efectos de metrología legal

(De conformidad con NTC 2031:2002 Numeral 3.5.7, tabla 6)

2. PROCEDIMIENTO DE CALIBRACION

Para la calibración se empleó el método de comparación directa con los patrones de masa y se sometió a las siguientes pruebas: excentricidad de carga, invariabilidad, linealidad, tara sustractiva y desviación lineal; cada una de las pruebas es clasificatoria y excluyente a la vez.

3. TRAZABILIDAD

El Laboratorio de Calibración de Masa de Metrolabor Ltda. asegura el mantenimiento de la trazabilidad de los patrones de referencia a Patrones Internacionales de Referencia.

3.1 PATRONES UTILIZADOS

Juego de pesas clase:	E2	Serie:	2520613	Código Interno:	LM8005
Fecha de calibración:	2013-05-19	Certificado de Calibración No.:	50504 DAKLS		
Termohigrómetro patrón:	EXTECH	Serie:	2012303	Código Interno:	LM8063
Modelo:	445715	Certificado de Calibración Temperatura No.:	MET-ET-CC 6785		
Fecha de calibración:	15/08/2013	Certificado de Calibración Humedad No.:	MET-EH-CC 3993		

4. CONDICIONES AMBIENTALES DURANTE LA CALIBRACION

Temperatura del Aire (°C)	21.4 a 21.7	Humedad relativa del Aire (%Hr)	46 a 43
---------------------------	-------------	---------------------------------	---------

5. RESULTADOS DE LA CALIBRACION

De acuerdo con los resultados de las pruebas de calibración, la Balanza Analítica Digital, **Cumple**, con los requisitos normativos respecto a los parámetros reportados por el fabricante. Teniendo en cuenta la división de escala (d) y el escalón de verificación (e) correspondiente, por lo tanto la balanza se clasifica como un instrumento de pesaje de funcionamiento no automático **Clase I (Especial)**. (De conformidad con NTC 2031:2002, Numeral 3.2, Tabla 1)



METROLABOR LTDA.
CERTIFICADO DE CALIBRACION
CALIBRATION CERTIFICATE



NUMERO: MET14-CC 7713
 Numero:

5.1. PRUEBA DE EXCENTRICIDAD DE CARGA

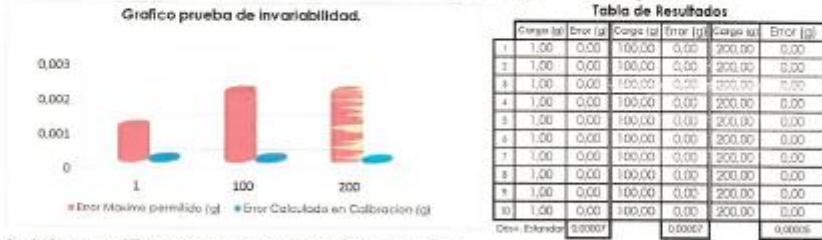
La Balanza presenta desviaciones respecto a la indicación en la posición centrada menores a 0,0003 g. (para Eec ≤ 0,0003 g, señalado por el fabricante [3^{da}]) y menores a 0,002 g, (error máximo permitido para el equipo, en el valor de la carga aplicado). **(De conformidad con NTC 2031:2002, numeral A4.7 y 3.6.2)**



Nota: los errores que se muestran en la gráfica corresponden al valor absoluto del error en cada punto.
Eec: Error por excentricidad de carga.

5.2 PRUEBA DE INVARIABILIDAD

Esta prueba corresponde a la desviación estándar de 10 mediciones en cada punto, con un tiempo de estabilidad de 10 segundos. Esta prueba se realizó con cargas de 1 g, 100 g y 200 g.



La balanza analítica presenta un comportamiento adecuado para sus características **(De conformidad con NTC 2031:2002, Numeral A4.10 y 3.6.1)**

5.3 PRUEBA DE LINEALIDAD

Consiste en hacer mediciones con valores de más convencional que se aproximen los valores de ¼, ½, ¾ de la carga máxima y la carga máxima del equipo sin tara, y valores de ¼ y ½ de la carga máxima con una tara entre ¼ y ½ de la carga máxima. El equipo se comporta de manera adecuada en dicha prueba de acuerdo con sus características actuales y las recomendadas por el fabricante **(De conformidad con NTC 2031:2002, Numeral A 4.4.1).**

Tara (g)	Carga (g)	Desviación (g)	Dev. Relativa (g)
0,00	50,00	-0,000200	-0,000004
0,00	100,00	-0,000300	-0,000003
0,00	150,00	-0,000200	-0,000001
0,00	200,00	-0,000200	-0,000001
100,00	50,00	0,000000	0,000000
50,00	100,00	0,000000	0,000000



METROLABOR LTDA.
CERTIFICADO DE CALIBRACION
CALIBRATION CERTIFICATE



NUMERO: **ME14-CC 7713**
 Number:

5.4 PRUEBA DE TARA SUSTRACTIVA

Las balanzas analíticas en un alto porcentaje se emplean para realizar pesados cuyos valores de masa son muy pequeños, por tanto es importante para el usuario revisar si la balanza tiene un buen desempeño en esta característica. Para ciclos de histéresis con cargas pequeñas este no debe sobrepasar la banda de la desviación lineal. La balanza presenta un comportamiento adecuado para sus características. **(De conformidad con NTC 2031:2002 Numeral A4.5.3)**

Tabla de Resultados

	Carga(g)	Dev. (g)	Carga(g)	Dev. (g)
0	0.00	0.000000	0.0	0.000000
1 ↑	0.01	-0.000100	0.1	0.000000
2 ↑	0.03	0.000000	0.3	0.000000
3 ↑	0.08	0.000100	0.8	0.000000
4 ↑	0.18	0.000000	1.8	0.000100
3 ↓	0.08	0.000000	0.8	0.000100
2 ↓	0.03	0.000000	0.3	0.000100
1 ↓	0.01	0.000100	0.1	0.000000
0	0.00	0.000000	0.0	0.000000

5.5 PRUEBA DE DESVIACION LINEAL (EXACTITUD)

Con esta prueba se pretende determinar en todo el campo de pesada que la indicación del instrumento sea acorde con la carga aplicada, de acuerdo con los límites o banda de desviación lineal señalada por el fabricante. El instrumento presenta un comportamiento adecuado para sus características. **(De conformidad con NTC 2031:2002 Numeral A 4.4.1 y tabla 4)**

5.5.1 CURVA PARA LA PRUEBA DE DESVIACION LINEAL (EXACTITUD)

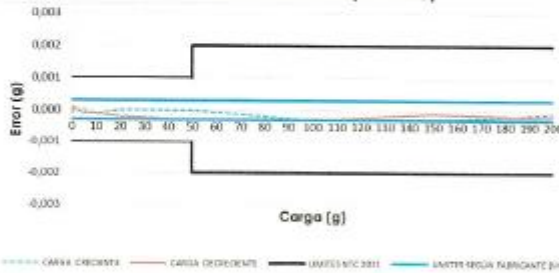


Tabla de Resultados

Carga (g)	Error Calculado (g)	
	Crecente	Decreciente
0.010000	-0.000100	0.000000
0.030000	-0.000100	0.000000
0.080000	0.000000	0.000000
0.100000	0.000100	0.000000
0.200000	-0.000100	0.000000
0.300000	0.000000	-0.000100
0.800000	0.000100	-0.000100
1.000000	0.000000	-0.000100
1.800000	-0.000100	-0.000000
2.000000	0.000000	-0.000100
3.000000	-0.000100	-0.000100
8.000000	-0.000100	-0.000100
10.000000	-0.000100	-0.000100
20.000000	0.000000	-0.000100
30.000000	0.000000	-0.000100
100.000000	-0.000100	-0.000000
150.000000	-0.000100	-0.000100
200.000000	-0.000100	-0.000000

6. FUNCION DE INCERTIDUMBRE

$$U = U_0 + k u_c = 0,0003 + 3,3E-06 * m w \text{ g}$$
 Donde mw es cualquier carga en gramo (g)

La incertidumbre reportada se ha determinado multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura $k=2$, con el cual se logra un nivel de confianza de aproximadamente 95%. La incertidumbre de medición expandida fue calculada de los componentes de incertidumbre de medida del patrón de referencia usado, de los pesajes y la corrección por empuje del aire. La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

7. OBSERVACIONES

- * Revisar periódicamente el comportamiento del instrumento, con el fin de asegurar la trazabilidad de las mediciones en él realizadas.
- * Encender el instrumento por lo menos 30 minutos antes de iniciar las mediciones.

[Signature]
 Ingeniero Mario Andrés Galindo H.
 Calibrado por: Checked by

[Signature]
 Ingeniero Carlos Alberto Triana R.
 Revisado por: Checked by