



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE QUÍMICA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR Cd
MEDIANTE GFAAS EN CACAO (*THEOBROMA CACAO*)”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

QUÍMICA

AUTORA: JESSICA MARIBEL GUAMÁN GUALANCAÑAY

DIRECTOR: Ing. CARLOS ALCIBAR MEDINA SERRANO MSc.

Riobamba – Ecuador

2021

©2021, Jessica Maribel Guamán Gualancañay

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Jessica Maribel Guamán Gualancañay. Declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 04 de agosto de 2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jessica G.' with a stylized flourish.

Jessica Guamán G.

C.I. 0604608976

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que el Trabajo de Integración Curricular. Tipo: Proyecto de Investigación “**VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR Cd MEDIANTE GFAAS EN CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**”, realizado por la señorita **JESSICA MARIBEL GUAMÁN GUALANCAÑAY**, ha sido minuciosamente revisada por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: CARLOS PILAMUNGA	2021-08-04
Ing. Carlos Alcibar Medina Serrano MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 Firmado electrónicamente por: CARLOS ALCIBAR MEDINA SERRANO	2021-08-04
Dr. Ángel Rigoberto Silva Delgado MSc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	ANGEL RIGOBERT O SILVA DELGADO  Digitally signed by ANGEL RIGOBERTO SILVA DELGADO Date: 2021.08.18 21:12:37 -05'00'	2021-08-04

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mis padres Luis y Margarita por el sacrificio que han realizado a lo largo de mi vida estudiantil por su apoyo incondicional que hizo posible la culminación de mis estudios con su bendición, consejos y palabras de aliento permitiéndome seguir por el camino correcto para sentirme afortunada y satisfecha de lograr uno de mis objetivos propuestos. A mis padrinos Gloria y Vinicio por su apoyo en todo por ser quienes junto a mis padres me han inculcado la responsabilidad luchar por las metas por esto le entrego este trabajo como símbolo de mi amor y agradecimiento a los estandartes de mi vida.

Jessica

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por brindarme salud y vida en la culminación de mis estudios universitarios, por ser la luz que me guio en todo este trayecto estudiantil. A mis padres Luis y Margarita a quienes me dieron la vida ejemplos claros de superación a mi hermana Marisol porque a pesar de todas las dificultades que se nos han presentado salimos adelante. A mis padrinos Gloria y Vinicio por su apoyo, paciencia y consejos en todo momento. A Consuelito y Gloria Veloz por ser el reflejo hacia donde quería llegar por su amistad y consejos brindados. A mi familia paterna y materna por su apoyo moralmente.

A mi docente de tesis Ing. Carlos Medina por guiarme con su conocimiento para la culminación del trabajo de titulación. Al personal del Laboratorio Chávez Solutions en especial al Doctor Luis Soto, Ing. Paulina Llive, Ing. Cristopher Sánchez, Ing. Katherine Nuggerud por su paciencia y guianza en el desarrollo experimental de la tesis por la amistad sincera con quienes he pasado momentos que no serán olvidados por su apoyo en el crecimiento a nivel profesional.

Jessica

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Validación del método según la norma ISO/IEC 17025.....	6
1.1.1. <i>Requisitos de validación</i>	6
1.1.2. <i>Parámetros de validación</i>	7
1.1.2.1. <i>Especificidad (selectividad)</i>	7
1.1.2.2. <i>Función de respuesta (linealidad/sensibilidad)</i>	8
1.1.2.3. <i>Límite de cuantificación y detección</i>	9
1.1.2.4. <i>Repetitividad</i>	11
1.1.2.5. <i>Intervalo de trabajo</i>	11
1.1.2.6. <i>Robustez</i>	11
1.1.2.7. <i>Incertidumbre</i>	12
1.1.2.8. <i>Recuperabilidad</i>	13
1.1.2.9. <i>Exactitud</i>	13
1.1.2.10. <i>Trazabilidad</i>	13
1.1.2.11. <i>Herramientas de validación</i>	14
1.1.3. <i>Controles de calidad</i>	14
1.1.3.1. <i>Control de calidad externo</i>	14
1.1.3.2. <i>Control de calidad interno</i>	14
1.2. Cacao.....	14
1.2.1. <i>Tipos de cacao</i>	16
1.2.1.1. <i>Fino aroma o criollo</i>	16

1.2.1.2.	<i>Cacao CCN-51</i>	16
1.2.2.	<i>Usos del cacao</i>	17
1.2.2.1.	<i>Alimentación</i>	17
1.2.2.2.	<i>Medicina</i>	16
1.3.	Metales Pesados	17
1.3.1.	<i>Cadmio</i>	18
1.3.1.1.	<i>Efectos del cadmio en la salud</i>	18
1.4.	Espectrometría de absorción atómica	18
1.5.	Base legal (si aplica)	20

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	21
2.1.	Hipótesis y variables	21
2.2.1.	<i>Operacionalización de variables</i>	22
2.2.2.	<i>Matriz de consistencia</i>	23
2.3.	Tipo y diseño de investigación.	24
2.3.1.	<i>Tipo de investigación</i>	24
2.3.2.	<i>Diseño de la investigación</i>	25
2.3.3.	<i>Diseño experimental</i>	25
2.3.4.	<i>Localización del estudio</i>	27
2.3.5.	<i>Unidad de análisis</i>	28
2.3.6.	<i>Población de estudio</i>	28
2.3.7.	<i>Tamaño de muestra</i>	28
2.4.	Selección de muestra	28
2.4.1.	<i>Método</i>	28
2.4.1.1.	<i>Preparación de curva de calibración</i>	28
2.4.1.2.	<i>Preparación de muestras</i>	30
2.5.	Análisis instrumental	31
2.5.1.	<i>Equipos, materiales y reactivos</i>	32
2.6.	Técnicas de recolección de datos	32
2.6.1.	<i>Objetivos y parámetros de validación</i>	32

CAPÍTULO III

3.	OBTENCIÓN DE RESULTADOS	34
3.1.	Caracterización de muestras de cacao	34
3.2.	Datos de validación	36
3.2.1.	<i>Ensayo de curva de calibración</i>	36
3.3.	Linealidad	38
3.4.	Repetibilidad	40
3.5.	Reproducibilidad	41
3.6.	Análisis de varianza	42
3.7.	Incertidumbre	45
3.7.1.	<i>Material de vidrio</i>	45
3.7.2.	<i>Calibración espectrofotómetro</i>	45
3.7.3.	<i>Estimación incertidumbre preparación patrón añadido</i>	47
	CONCLUSIONES	49
	RECOMENDACIONES	50
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Esquema de diseño experimental	24
Tabla 2-2:	Modelo para recolección de datos de una muestra de alimentos que contiene Cd. ...	25
Tabla 3-2:	Preparación de curva de calibración a partir de estándar madre 100 ug/L.	28
Tabla 4-2:	Programa de Horno de Grafito para Cadmio.	30
Tabla 5-2:	Objetivo y criterio de aceptación para la validación del método analítico.	32
Tabla 1-3:	Promedio de concentración de Cd en diferentes muestras de cacao.	36
Tabla 2-3:	Estudio realizado con promedios y % de recuperaciones.	36
Tabla 3-3:	Estudio realizado con promedios y % de recuperaciones.	37
Tabla 4-3:	Parámetros estadísticos función-respuesta de las curvas de calibraciones.	38
Tabla 5-3:	Repetibilidad de datos de Cd en cacao a diferentes niveles.	40
Tabla 6-3:	Repetibilidad de datos para la curva de calibración.	39
Tabla 7-3:	Análisis estadístico de Cd en cacao respecto a reproducibilidad.	40
Tabla 8-3:	Análisis estadístico de la curva de calibración.	40
Tabla 9-3:	Resultados de todos los estándares de Cd en la curva de calibración.	41
Tabla 10-3:	Análisis estadístico de varianza con respecto a Cd en cacao.	43
Tabla 11-3:	Estimación de la incertidumbre de material de vidrio.	44
Tabla 12-3:	Incertidumbre de calibración.	45
Tabla 13-3:	Datos obtenidos de la estimación de incertidumbre en la determinación de Cd.	45
Tabla 14-3:	Incertidumbre de calibración Cd en cacao.	47
Tabla 15-3:	Estimación incertidumbre de Cd respecto a cacao.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Proceso de validación de un método.....	7
Figura 2-1:	Cálculo de la desviación estándar, usada en la estimación de LOD y LOQ.	10
Figura 3-1:	Cacao	16
Figura 1-2:	Localización del Laboratorio CHÁVEZ SOLUTIONS	26

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Lectura de caracterización de muestras de cacao.	34
Gráfico 2-3:	Curva de calibración día 1 absorbancia vs concentración.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: INFORME DE VALIDACIÓN CD EN CACAO.

ANEXO B: PROCEDIMIENTOS EN LA VALIDACIÓN DE CD EN CACAO.

ANEXO C: INFORME ANTI PLAGIO

RESUMEN

El presente trabajo describe la validación del método para determinar cadmio (Cd) en cacao (*Theobroma cacao*) mediante Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS), por medio de la lectura de muestras triplicas de distintas procedencias (costa, oriente y cacao orgánico). Se verificó que las concentraciones son de 0.645, 0.504 y 0.392 mg/kg respectivamente. Para la caracterización se optó por el cacao que contiene menor concentración del metal. Los valores obtenidos no superan el límite máximo residual sugerido por la Unión Europea. Basándose en el protocolo de validación de la Unión Europea y la guía AOAC 999.11. Durante tres días y dos analistas, se procede a la preparación de las muestras, replicando seis veces los blancos y las muestras fortificadas a: nivel bajo, medio y superior. Una vez caracterizado se procedió a calcinar las muestras para posteriormente digerir y fortificar. Se utilizó como instrumento el equipo de absorción atómica Perkin Elmer 800, acoplado al horno de grafito. Para el análisis estadístico se empleó: ANOVA, fisher, homogeneidad de varianzas y cálculos de incertidumbre. Cumpliendo con los objetivos de validación planteados en los siguientes requerimientos: selectividad, linealidad-función respuesta, límites de detección y cuantificación, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) con el coeficiente de variación <10%, exactitud (recuperación) que oscila entre 80 y 120% en todos los niveles. La incertidumbre obtenida es menor a 33% en el nivel más bajo con intervalo de confianza (K=2). Se concluye que el método es válido en todos los parámetros críticos antes mencionados. Se recomienda utilizar lámparas con energía suficiente (>50%) y ajustes a las curvas de calibración.

Palabras claves: < ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO (GFAAS)>; <VALIDACIÓN ANALÍTICA>; <METALES PESADOS>; <CADMIO (Cd)>; <MÉTODO ANALÍTICO>; <CACAO (*Theobroma cacao*)>.

LEONARDO
FABIO
MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION-ECIBCE, l=QUITO,
serialNumber=0000621485,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.08.31 12:03:33 -05'00'



1542-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

This research describes the validation of the method to determine cadmium (Cd) in cocoa (*Theobroma cacao*) by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS), using the reading of triplicate samples from different sources (coast, east and organic cocoa). It was verified that the concentrations are 0.645, 0.504 and 0.392 mg / kg respectively. For the characterization, cocoa was used since it contains a lower concentration of metal. The values obtained do not exceed the maximum residual limit suggested by the European Union. Based on the European Union validation protocol and AOAC 999.11 guideline. For three days, two analysts prepared the samples, replicating the blanks and the fortified samples six times at low, medium and higher levels. The instrument used was the Perkin Elmer 800 atomic absorption equipment coupled to a graphite furnace. For the statistical analysis, ANOVA, fisher, homogeneity of variances and uncertainty calculations were used. The proposed validation objectives were met in the following requirements, selectivity, linearity-response function, limits of detection and quantification, precision (repeatability and reproducibility) with the coefficient of variation <10%, accuracy (recovery) ranging between 80 and 120% at all levels. The uncertainty obtained is less than 33% at the lowest level with confidence interval ($K = 2$). It is concluded that the method is valid in all the critical parameters mentioned above. It is recommended to use lamps with sufficient energy (> 50%) and adjustments to the calibration curves.

Keywords: <ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY WITH A GRAPHITE FURNACE (GFAAS)>; <ANALYTICAL VALIDATION>; <HEAVY METALS>; <CADMIUM (Cd)>; <ANALYTICAL METHOD>; <CACAO (*Theobroma cacao*)>.

INTRODUCCIÓN

La validación de un método para la determinación de metales pesados se realiza a través de estudios en laboratorios dando características y técnicas del método que se vaya a validar, cumpliendo con todos los requerimientos necesarios previo al resultado analítico que se vaya a obtener (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p.10).

Los laboratorios a nivel mundial cuentan con acreditadores externos, en nuestro país la entidad reguladora se denomina SAE (servicio de acreditación ecuatoriano) que es un ente encargado de acreditar los procedimientos de cada uno de los laboratorios. Dichos procesos se basan en normas INEN ISO IEC 17025, bajos criterios y guías recomendados por el SAE y sistemas de normalización internacional, donde se respalden la metodología y resultados, así como su calidad y eficiencia. Por este motivo CHAVEZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda. Requiere ampliar sus servicios a la ciudadanía con el desarrollo de diferentes análisis, en alimentos para el cual debe realizar procesos de acreditación para la determinación de metales pesados en matrices de alimentos. De esta manera puede establecer la metodología, parámetros de exactitud, incertidumbre, linealidad, rangos de error, controles de calidad brindando un resultado que garantice la veracidad al cliente (Sanmiguel Torres y Guerrero Carrera, 2017, p.1).

Para la acreditación de dicho método se llevará a cabo la técnica de espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS), los datos se obtendrán de matrices de alimentos (almendras de cacao), para validar el procedimiento analítico que implica análisis de datos estadísticos determinando límites de detección, cuantificación, precisión, exactitud, incertidumbre e intervalos de trabajo (Sanmiguel Torres y Guerrero Carrera, 2017, p.1).

A partir de enero de 2019 la normativa de la unión europea otorga nuevos límites máximos residuales para metales pesados como el Cadmio y Plomo de 1 y 3 mg/kg respectivamente presentes en las almendras de Cacao y en algunos vegetales (Comisión Europea, 2014, p.4).

Antecedentes

El excesivo consumo de productos alimenticios que contienen altas concentraciones de metales pesados conduce a la acumulación crónica de los mismos en órganos como el riñón y el hígado, interrumpiendo ciertos procesos bioquímicos, provocando enfermedades cardiovasculares, nerviosas, renales y óseas (Fiallos Morales, 2017, p. 3).

Básicamente, los alimentos están relacionados a la cadena trófica y su contaminación causa daños a la salud. El agua de riego es la principal causa de contaminación, en estos se presencia: residuos de fertilizantes, desechos industriales, mineros que son arrojados en las alcantarilladas. Los metales arrastrados por el agua llegan a acumularse en el suelo y en las plantaciones. Las plantas absorben todo tipo de minerales y nutrientes del suelo, en estos se encuentra trazas de metales pesados lo que dificulta su degradación y eliminación en el procesado de los alimentos. El aire se contamina por la emisión de gases de los vehículos o industrias (Hernández et al., 2017, p. 2).

El laboratorio ambiental Chávez Solutions S.A., brinda diversos servicios de análisis ambientales para una variedad de industrias y organizaciones particulares o privados. Entre los requisitos técnicos establecidos en la norma ISO/IEC 17025 se encuentra la validación de métodos. La empresa para el análisis de los servicios que oferta, se encuentra debidamente acreditado según la NORMA ISO/IEC 17025:2017 otorgados por el SAE. Actualmente el laboratorio Chávez Solutions se dedica al análisis físico-químico: de gases, aguas, suelos, calidad de aire y monitoreo de ruido de esta manera deseando implementar el análisis de alimentos de esta manera, trabajando en una estructura organizacional ética y profesional empleando tecnología de punta en cada servicio cumpliendo con altos estándares de calidad salud y seguridad (CHAVEZ SOLUTIONS, 2020, párr. 1).

Planteamientos del problema:

A lo largo de los años los productos alimenticios de consumo diario han presentado trazas de metales, esto a consecuencia del uso de fertilizantes y el agua de riego además de ello se sigue aumentando la concentración de la misma con el proceso de industrialización en donde se utilizan enlatados.

Para contrarrestar este tipo de contaminaciones los investigadores han desarrollado una serie de metodologías para la determinación de metales. Cumpliendo parámetros internacionales para que cada uno de los laboratorios que deseen brindar servicios de análisis en alimentos de cualquier índole se rijan a dichas normas o guías. El cacao ecuatoriano presenta trazas de metales pesados sin embargo antes de ser consumido y exporta necesita cumplir con ciertos parámetros. Para que el cacao pueda ingresar al mercado europeo se debe regir al sistema europeo de control de inocuidad alimentaria. El límite máximo residual de Cd en el cacao basado en el reglamento de la comisión del codex alimentarius no debe sobre pasar de 1 ppb.

Los laboratorios que ofertan análisis de alimentos tienen que poseer la acreditación de los procedimientos adecuados para brindar un resultado real al cliente. Todos los métodos analíticos acreditados deben basarse en: protocolos, guías, normas y documentos que estén relacionados con la validación de métodos donde se precisen los diferentes parámetros a cumplirse, brindando resultados eficaces y veraces. Así como también cada uno de los laboratorios debe poseer su propia acreditación interna guiada en procedimientos específicos elaborados dentro del laboratorio. Cumpliendo con todos los requerimientos se alcanza la acreditación externa regulada por el SAE en nuestro país (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p. 8).

Formulación del problema:

Chávez Solutions ambiental no posee una metodología mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito validado para la determinación de metales pesados en alimentos.

Justificación

Durante las últimas décadas se han reportado algunos impactos en la salud derivados del consumo de alimentos que contienen metales pesados tales como plomo y cadmio. Esto ha generado preocupación en diversos grupos de investigadores en especial a los alimentos de exportación. El reglamento alimentario de la unión europea hasta el año 2000 al cacao de fino aroma ecuatoriano permitía un límite máximo residual de 0,8 mg/kg para el Cd. Pero a partir de enero de 2019 según la normativa europea (CODEX ALIMENTARIUS y reglamento general de alimentos), considera límite de 1 mg/kg.

Los laboratorios de calidad que ofrecen servicios de análisis en diferentes áreas como: agua, suelos y aire se deben regir a ciertos parámetros para ofertar mencionados estudios. La empresa Chávez Solutions Ambientales Cía. Ltda. Desea implementar en sus servicios el análisis de alimentos por consiguiente debe cumplir con certificaciones adecuadas bajo normas de estandarizaciones apropiadas. Para ello se desea validar diferentes métodos de análisis en este caso para determinar la cantidad de metal pesado (Cd) presente en el cacao, por tanto, se debe realizar una validación del método empleando el equipo de absorción atómica de horno de grafito. Analizando los diferentes parámetros establecidos que se llevan a cabo en una validación donde se abarca los límites de detección y cuantificación en lo que respecta a la precisión y exactitud del método. Además, para los criterios de aceptación o rechazo relacionar los valores de exactitud e incertidumbre para su respectiva acreditación (Sanmiguel Torres y Guerrero Carrera, 2017, p. 2).

La importancia de validar la metodología para determinar Cd presente en alimentos se vincula con la generación de ensayos en diferentes matrices que contengan aquellos metales de esta manera, se puede verificar que las pruebas para la detección de Cd sean veraces, confirmando que el ensayo en consideración es confiable y eficiente.

Objetivos:***Objetivo general:***

- Validar el método para la determinación de metales pesados (Cd), mediante GFAAS en cacao para el laboratorio CHÁVEZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda.

Objetivos específicos:

- Verificar la metodología analítica empleando el equipo de absorción atómica con horno de grafito para la validación de metales pesados (Cd) en alimentos.
- Comprobar si cumple normas nacionales e internacionales para el consumo – venta y comercialización de cacao.
- Cumplir con los objetivos de validación planteados en el Laboratorio Chávez Solutions mediante un informe para acreditar el método de análisis de metales en matrices de alimentos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Validación del método según la norma ISO/IEC 17025

Para que un laboratorio esté debidamente acreditado debe regirse en las normas ISO/IEC 17025 específicamente en el apartado de: “Requisitos generales para la competencia de Laboratorios de ensayo y calibración” que abarca el numeral 5.4.5 “Validación de los métodos” (ISO / IEC 17025 : 2005, 2005, p. 14).

Resumiendo, la validación es aquel proceso que con lleva una serie de ensayos normalizados y experimentales donde se puede obtiene datos como es: exactitud, precisión, incertidumbre, intervalos de trabajo, etc. Para el desarrollo de las validaciones se cuenta con guías, documentos, trabajos donde estén detallados el procedimiento a realizarse, con el cumplimiento de todas las normas finalmente el laboratorio es acreditado por el SAE (Robledo Vélez y Castaño Puerta, 2012, p. 28).

1.1.1. Requisitos de validación

Cuando se enfrenta un problema para el que se desea encontrar una solución, los laboratorios tienen que revisar dentro de sus métodos existentes si se halla un proceso adecuado para la solución del problema. Caso contrario se debe guiar en la elaboración de una metodología basa en guías ya existentes, para lo cual se debe de continuar hasta tener un proceso que cumpla con exigencias adecuadas como se detalla a continuación en la figura: (Robledo Vélez y Castaño Puerta, 2012, p. 30-31).

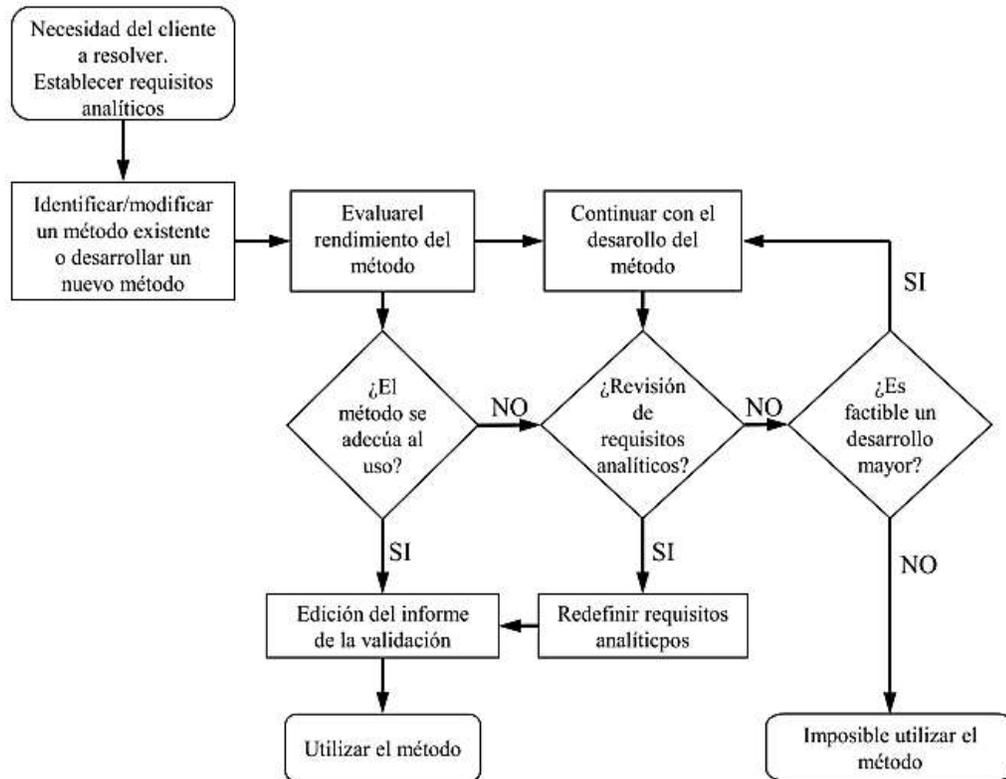


Figura 1-1: Proceso de validación de un método.

Fuente: (Robledo, Vélez, y otros, 2012).

1.1.2. *Parámetros de validación*

Como en cualquier tipo de análisis la validación debe cumplir con una serie de parámetros los que se detallan a continuación:

1.1.2.1. *Especificidad (selectividad)*

En esto se refiere a la selección del analito donde se mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos. En presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método, se determina añadiendo materiales que podrían encontrarse en la muestra (Utreras Peñafiel y Tapia Calvopiña, 2021, p. 65).

La especificidad depende de la concentración y debe determinarse el margen de error de calibración en su nivel más bajo.

La especificidad / selectividad es donde el método tenga la capacidad de medir solo el analito de interés (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p. 19).

1.1.2.2. Función de respuesta (linealidad/sensibilidad)

a) Linealidad:

A la función de respuesta instrumental se conoce con la ecuación de la recta de calibración [L=f(P)]. Para este tipo el investigador tiene que realizar varias muestras donde la única información que se tiene es la de la concentración del analito, mediante la interpolación de las gráficas de calibración se obtendrá la concentración de una muestra X (Reisancho Reisancho, 2009, p.4).

b) Sensibilidad:

La sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p.15).

Para el intervalo lineal de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración y es un parámetro objeto de seguimiento cuando se efectúan calibraciones habituales (Reisancho Reisancho, 2009, p.5).

Ecuación para calcular la pendiente:

$$b = \frac{\sum (X_i - X) * (Y_i - Y)}{\sum (X_i - X)^2}$$

Donde:

X_i= concentración ug/L

Y_i= Absorbancia

Y= Absorbancia promedio

X= concentración promedio ug/L

Ecuación para calcular Intercepto:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N Y_i - b \sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

Ecuación para calcular coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{\sum(Xi - \bar{X})(Yi - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(Xi - \bar{X})^2 \sum(Yi - \bar{Y})^2}}$$

Ecuación para calcular error tipo de estimación de y:

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (Yi - \bar{Y})^2}{N - 2}}$$

Ecuación para calcular error tipo de estimación de X (Sxy):

$$S_{yx} = \frac{S_{yx}}{b}$$

Ecuación para calcular desviación estándar de la pendiente (Sb):

$$S_b = \frac{S_{yx}}{\sqrt{\sum(Xi - \bar{X})^2}}$$

Ecuación para calcular desviación estándar del intercepto (Sa):

$$S_a = \frac{s_{yx} \sqrt{\sum_i^n Xi^2}}{\sqrt{\sum(Xi - \bar{X})^2}}$$

Ecuación para calcular intervalo de confianza para pendiente (b Min y Max):

$$b_{Min} = b - t * S_b$$

$$b_{Máx} = b + t * S_b$$

Ecuación para calcular intervalo para intercepto (a Min y Max):

$$a_{Min} = b - t * S_a$$

$$a_{Máx} = b + t * S_a$$

(Sanmiguel Torres y Guerrero Carrera, 2017, p. 36-37).

1.1.2.3. Límite de cuantificación y detección

- a) Límite de detección (LDD): Es la concentración mínima de un analito que se puede detectar confiablemente cuando se aplica un método para el análisis de una muestra. Para el límite de

detección del método se basa en las muestras analizadas que se calcula multiplicando la desviación estándar por un factor de 3. El límite de detección es un parámetro sensible pudiendo ser afectado por cambios menores del sistema analítico como por ejemplo la temperatura, pureza de reactivos, o que el equipo no esté debidamente calibrado (Álvarez Castillo y Coral Carrillo, 2017, p. 18.).

Según la AOAC (Methods of Analysis of the Association) lo define como aquel valor medido con certeza estadística razonable, de acuerdo a la ISO lo determina como aquella cuantía mínima detectable, y finalmente la IUPAC lo cataloga como un valor certero mínimo detectable (Utreras Peñafiel y Tapia Calvopiña, 2021, p. 66).

b) Límite de cuantificación (LC): El límite de cuantificación es aquella cantidad más pequeña del analito en una muestra, que puede ser cuantitativamente determinada con un nivel de exactitud y precisión aceptable de repetitividad y veracidad, también se define por diversas convenciones como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5,6 o 10 desviaciones estándar en la media del blanco, en algunos casos también se le conoce como límite de determinación (Álvarez Castillo y Coral Carrillo, 2017, p. 19).

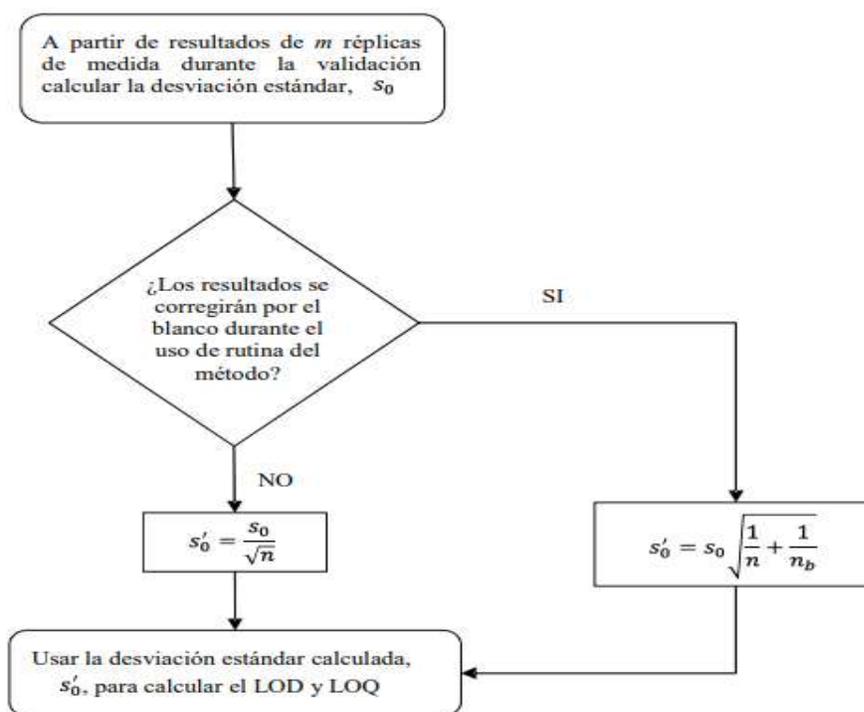


Figura 2-1: Cálculo de la desviación estándar, usada en la estimación de LOD y LOQ.

Fuente: (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016).

Donde:

S_0 Desviación estándar estimada de m resultados individuales en o cerca de concentración cero.

S'_0 Desviación estándar para el cálculo de límite de detección y cuantificación.

n Número de réplicas de observación promediadas, donde cada réplica es obtenida siguiendo enteramente el procedimiento de medición.

n_b Número de observaciones de blanco promediadas calculado de la corrección del blanco (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p. 23).

1.1.2.4. Repetitividad

La repetición es principal para alcanzar apreciaciones fiables de características de desempeño del método, como es la precisión y el sesgo. La precisión: es aquella medida que sirve para relacionar los resultados entre sí, se precisa un número mínimo de 6 réplicas. Para el sesgo se lo determina comparando las medias de los resultados (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p. 35).

1.1.2.5. Intervalo de trabajo

Es necesario determinar el intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede emplear el analito; esto se refiere al intervalo de concentraciones de las disoluciones efectivamente medidas y no a las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentraciones el factor limitante es el valor del límite de detección y/o cuantificación; en el extremo superior el alcance depende de la respuesta del instrumento o de condiciones analíticas establecidas como óptimas (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p.27).

El intervalo lineal es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida del analito responde linealmente a la concentración, Se verifica mediante la obtención de un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,995 (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p.27).

En la validación del método se evalúa el intervalo de trabajo del instrumento y del método. El intervalo de trabajo del método está ligada a la concentración de la muestra analizada. Mientras que para el intervalo del instrumento se basa en la medición de una muestra analizada y ensayada previamente (Araujo, Tapia y Villamarín Ortiz, 2020, p. 22).

1.1.2.6. Robustez

Es una medida de su capacidad para permanecer no afectada por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal (Araujo, Tapia y Villamarín Ortiz, 2020, p. 23).

Este parámetro se aplica en el desarrollo del procedimiento, en el cual se realiza variaciones deliberadas al método y se cuantifica su efecto mediante el rendimiento. Las pruebas de robustez se realizan generalmente para investigar su efecto sobre la exactitud y precisión del método (Reisancho Reisancho, 2009, p. 5).

1.1.2.7. Incertidumbre

La incertidumbre en procesos de validación es aquel parámetro que permite determinar la dispersión de valores atribuidos, se puede determinar de manera cualitativa o cuantitativa. Es aquel resultado que nos indica que tan alejado o cercano es a la veracidad de la respuesta (Robledo Vélez y Castaño Puerta, 2012, p. 33).

a) Incertidumbre típica:

Es aquel resultado producto de la medición, para la cual se debe de establecer parámetros, causas u orígenes de perplejidad posibles que afecten a Xi. Además, se debe de conocer los orígenes de perplejidad agrupándolos en dos subcategorías, para de esta manera estimar su valor numérico.

Tipo A: en este tipo es donde se realiza un estudio estadístico y se determina la desviación máxima de repetibilidad y reproducibilidad.

Tipo B: en estos se encuentran las resoluciones de incertidumbre de los equipos usados ya sea materiales de vidrio o materiales de referencia debidamente certificados.

b) Incertidumbre acumulada:

En este tipo de incertidumbre se realiza mediante un cálculo numérico donde es la raíz cuadrada de la suma de las incertidumbres típicas de tipo A y B.

$$U_{acumulada} = \sqrt{\text{incertidumbre típica tipo A} + \text{incertidumbre típica tipo B}}$$

c) Incertidumbre expandida:

Es aquel cálculo matemático que nos da como resultado un intervalo alrededor del resultado de la medición, en base al factor de cobertura.

$$U_{expandida} = U_{acumulada} * k$$

d) Factor de cobertura (k):

Es aquel número que se puede considerar como un intervalo de confianza usada para calcular la incertidumbre expandida el cual es el producto de la incertidumbre acumulada por el factor de cobertura.

1.1.2.8. Recuperabilidad

Este es un parámetro donde se examina la capacidad del método donde se conoce la obtención del analito, el cual debe ser más próximo a la real.

$$\%Recuperabilidad = \frac{Valor\ obtenido\ x\ 100}{valor\ teórico}$$

1.1.2.9. Exactitud

Es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, podemos realizar una evaluación práctica de la veracidad. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de 'sesgo' (Eurolab España P.P y Colaboradores, 2016, p. 38).

- a) Veracidad: es aquel donde se basa en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores de referencia, esto se puede verificar mediante dos metodologías ya sea esta con un material de referencia o con un método previamente ya validado y caracterizado.
- b) Materiales certificados de referencia: es aquel material referencial que por lo general posee un certificado de matriz natural, estos tipos de materiales pueden ser de distintas índoles ya sea preparado internamente o muestras típicas que contengan el analito (Araujo, Tapia y Villamarín Ortiz, 2020, p. 26).

1.1.2.10. Trazabilidad

Es aquel parámetro donde se puede verificar las comparaciones diversas asemejándose en la veracidad del resultado, en este se comprueba la ausencia del sesgo o el error sistemático (Reisancho Reisancho, 2009, p. 37).

1.1.2.11. Herramientas de validación

En lo que respecta a las herramientas de validación se hace referencia las siguientes:

- Blanco.
- Materiales de referencia certificados.
- Muestras.

1.1.3. Controles de calidad

1.1.3.1. Control de calidad externo

Se refiere a controles de calidad realizados mediante comparaciones con resultados obtenidos de la misma muestra enviados a analizar en otro laboratorio.

1.1.3.2. Control de calidad interno

Se refiere a controles donde se realiza dentro del mismo laboratorio con blancos, patrones calibrados, guías específicas, patrones adicionales para determinar la veracidad y similitud de los resultados en las diversas muestras.

1.2. Cacao

El cacao proviene de la familia de las esterculiáceas su nombre científico es *Theobroma cacao*, al grano y a las semillas se le conoce como cacao, este es un producto de gran importancia a nivel económico de los países exportadores del cacao. Este producto se encuentra en casi toda América del Sur y en México. Los países que exportan a nivel mundial son Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Perú y México abarcando entre un 70% y 100% según los datos obtenidos de la ICCO (Organización internacional del cacao), debido a que en estos países se encuentra gran variedad genética de dicho producto (ANECACAO, 2015, párr. 4).

El Ecuador se ha posicionado como un país de excelencia en la exportación del cacao fino de aroma su producción abarca cerca de 200,00 toneladas por año. En esta producción se encuentran inmiscuidos alrededor de 100 mil familias de pequeños productores el cual representa un 99% del

total de la cadena de provisión, sin embargo, de estos un 80% utiliza productos agroquímicos en la producción del cacao y el restante se agrupan en asociaciones.

Actualmente, el Ecuador abastece más de la mitad del volumen de cacao fino o de aroma transado en el mercado mundial, a partir de la cosecha de huertas tradicionales y modernas de cacao del tipo Nacional. Se siembran 365 mil hectáreas, en su mayoría en manos de pequeños productores. El principal mercado de acogida de cacao ecuatoriano es el europeo, para esto se debe de regir a ciertos parámetros que exige la unión europea a partir de enero de 2019 (CEFA, 2015, párr. 6-7).

El límite máximo residual en las almendras de cacao es de 1 mg/kg sin embargo, para sus derivados se considera los siguientes parámetros:

- Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao $< 30\%$ debe contener un límite máximo residual de 0.10 mg/kg
- Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $< 50\%$ debe contener un límite máximo residual de 0.30 mg/kg
- Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 30\%$ debe contener un límite máximo residual de 0.30 mg/kg
- Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 30\%$ debe contener un límite máximo residual de 0.80 mg/kg
- Cacao en polvo (vendido al consumidor) debe contener un límite máximo residual de 0.65 mg/kg (Comisión Europea, 2014, p. 4).

El suministro de cacao contribuye al desarrollo del mercado internacional de los cacaos fino o de aroma. Además, es un rubro importante de ingresos para el país. En la resolución de la organización internacional de cacao (ICCO), ratifica al Ecuador como un país productor de cacao fino y de aroma en un 75%, siendo esto una victoria en esencial para los productores, asociaciones de cacao fino y de aroma. Aproximadamente se siembran 365 mil hectáreas de cacao que en su gran mayoría pertenece a pequeños productores (CEFA, 2015, párr. 8).



Figura 3-1: Cacao

Fuente: (Ciudadano, 2015)

1.2.1. Tipos de cacao

1.2.1.1. Fino aroma o criollo

La producción anual del país es de 160.000 toneladas de cacao fino. Con esto se cubre el 70% de la oferta mundial del grano “criollo”. Este tipo de cacao es utilizado en todos los chocolates refinados. La principal característica de este tipo de cacao es su coloración amarilla, además de ello tiene un sabor único y aroma inigualable lo que hace que sea apetecido a nivel mundial en elaboración de derivados de cacao de tipo gourmet (GoRaymi, 2020, párr. 1-3).

Sin embargo, lo que muchos no saben es que el chocolate fino se distingue por su pureza, específicamente, el sabor y fragancia que el cacao tiene (ANECACAO, 2015, párr. 3).

1.2.1.2. Cacao CCN-51

Este tipo de cacao se le denomina también Colección Castro Naranjal, su principal característica es que el grano posee un color rojo, estos granos son de gran utilidad en la extracción de semielaborados tal como el ingrediente esencial en la elaboración en gran cantidad del chocolate (GoRaymi, 2020, párr. 7).

1.2.2. Usos del cacao

Este producto es recomendado por su aporte energético al organismo, ya que estos contienen vitaminas esenciales como la A, B, calcio, minerales, antioxidantes ya que contiene gran cantidad de flavonoides y sobre todo un alto contenido de grasas necesarios para el organismo.

1.2.2.1. Alimentación

Usado principalmente en la fabricación de derivados como son los chocolates, mix en frutas, bebidas, fermentados, rellenos en golosinas.

1.2.2.2. Medicina

De acuerdo a investigaciones científicas se ha encontrado al cacao como un potencial para aliviar el cansancio, curar, ayudar a los problemas intestinales, renales e inclusive la fiebre.

1.3. Metales Pesados

La mayoría de los elementos que se encuentran en la corteza terrestre son metales. Se denomina metales pesados por que la densidad de estos elementos es elevada, lo que dificulta su degradación concentrándose en los componentes de la cadena trófica. En la actualidad se conoce como metales tóxicos (Hernández et al., 2017, p. 2).

Dependiendo de la concentración en que se encuentren representan cierta toxicidad para el ser humano, siendo especialmente tóxicos sus iones y compuestos. Se consideran en esta categoría los siguientes elementos químicos: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Zinc (Zn) (Hernández et al., 2017, p.2).

El contenido de metales tóxicos en los alimentos va a depender de las condiciones del medio ambiente, los métodos de producción y el lugar de origen del alimento. Por lo general, los metales tóxicos que encontramos a menudo en los alimentos son: el plomo, cadmio, mercurio, arsénico. A la cadena alimentaria la vía de ingreso es mediante la absorción de nutrientes a través de las raíces de las plantas. En los nutrientes que contiene el suelo y el agua se encuentra inmiscuidos los metales (Hernández et al., 2017, p. 3).

1.3.1. Cadmio

El cadmio es un metal pesado considerado como uno de los elementos más tóxicos, junto con el mercurio y el plomo. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza asociado a distintos minerales.

Se han determinado altas concentraciones de cadmio en mariscos, productos de casquería como el hígado y el riñón, en semillas oleaginosas, granos de cacao y en ciertas setas. Cereales como el arroz y el trigo, vegetales de hoja verde, patatas y hortalizas de raíz como la zanahoria contienen las concentraciones más altas de cadmio, y se estima que más de 80% de la ingesta del metal procede de este tipo de alimentos. Según una recopilación de datos a nivel internacional realizada por Järup y Åkesson (2009) la ingesta de cadmio con los alimentos varía entre 8 y 25 µg por día (Sánchez Barrón, 2016, p. 1).

1.3.1.1. Efectos del cadmio en la salud

El cadmio es un metal pesado por el cual en el organismo causa daños severos en el sistema inmune, sistema nervioso central, falencias en la reproducción, desórdenes psicológicos inclusive provocando daños en el ADN y la mayoría de las veces se refleja en el desarrollo del cáncer. Los efectos leves de cadmio en el organismo pueden presentarse mediante síntomas de diarrea, dolor abdominal, vómitos y náuseas severas. Este tipo de metal presenta un riesgo para la salud de carácter crónico, donde la principal afección es a los huesos, riñones además de ello ataca fácilmente a las personas que poseen bajos niveles de hierro (Pérez García y Azcona Cruz, 2012, p. 200).

1.4. Espectrometría de absorción atómica

Entre los métodos espectrométricos para análisis de identificación y cuantificación de elementos presentes en diversas muestras se encuentra la: espectrometría atómica que es un método donde convierte los elementos presentes de una muestra en átomos o iones elementales en estado gaseosos mediante un proceso llamado atomización.

Los métodos más usados para la atomización son: absorción atómica con llama (FAAS) y absorción atómica en horno de grafito (GFAAS).

El método de GFAAS es aquel que permite detectar límites de partes por billón (ppb), esta técnica se basa en absorber la luz por parte de un elemento en estado atómico. La longitud de onda a la cual

tiene que ser absorbida la luz se especifica en cada elemento. La cantidad de radiación absorbida tiene que ser proporcional a la cantidad del átomo presente del elemento (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

Dicha técnica se fundamenta en 2 procesos:

- Atomización de la muestra;
- Absorción de radiación proveniente de una fuente por los átomos libres.

Para analizar una muestra se debe tomar en cuenta los siguientes pasos:

- Secado: una vez que la muestra ha sido inyectada en el tubo de grafito, se calienta a una temperatura inferior al punto de ebullición del solvente (usualmente entre 80 a 180 °C). El objetivo de esta etapa es la evaporación del solvente. La muestra inyectada (2-20 µL) en el horno de grafito. Aquí se evaporan el solvente y los componentes volátiles de la matriz.
- Calcinado. El próximo paso del programa es el calcinado por incremento de la temperatura, para remover la mayor cantidad de material (materia orgánica) de la muestra como sea posible, sin pérdida del analito. La temperatura de calcinación usada varía típicamente en el rango de 350 a 1600 °C. Durante el calcinado, el material sólido es descompuesto mientras que los materiales refractarios permanecen inalterados.
- Atomización. En esta etapa, el horno es calentado rápidamente a altas temperaturas (1800-2800 °C) para vaporizar los residuos del paso de calcinado. Este proceso lleva a la creación de átomos libres en el camino óptico. En este paso se mide la absorbancia. La temperatura de atomización depende de la volatilidad del elemento.

(«Determinación de Metales por absorción atómica - Horno de Grafito» 2016, p. 1).

Para la limpieza del horno se debe de someter a una temperatura superior a la de atomización. Cuanto mejor sea la separación de los elementos que acompañan analito, mejor será la atomización y la determinación estará más libre de interferencias (Beaty y Kerber, 2003, p. 20).

En el método de absorción atómica con horno de grafito se usa como combustible el argón, las muestras se preparan a partir de una muestra estándar que viene en 1000 ppb, las muestras preparadas tienen que ser de diferentes concentraciones para realizar las curvas de calibración.

El software que comúnmente se usa es el WINLAB 32.

1.5. Base legal (si aplica)

La Norma ISO/IEC 17025: 2017 establece los requisitos generales relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración que el SAE utiliza como criterios para la acreditación (CHAVEZ SOLUTIONS, 2020, párr. 1).

Los parámetros de desempeño en el proceso de validación se lo realizan usando equipos dentro de especificaciones adecuadas, es decir que estén trabajando correctamente y las respectivas calibraciones certificadas. De igual manera el operador que realiza la validación debe ser técnicamente competente y tener experiencia en ese campo para poder tomar decisiones adecuadas a medida que avanza el estudio (CHAVEZ SOLUTIONS, 2020, párr. 3).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Hipótesis y variables

a) *Hipótesis general*

El método empleado en la determinación de niveles de Cd en el cacao cumple todos los parámetros de validación sujetos a normas estandarizadas.

b) *Hipótesis específicas*

El equipo de horno de grafito servirá para la validación de Cd en cacao.

La metodología desarrollada en base a la guía AOACC 999.11 será factible para determinar Cd en cacao.

2.2. Identificación de variables

a) *Variable dependiente:*

Cuantificación de niveles de Cd en almendras de cacao.

b) *Variable independiente:*

Longitud de onda.

2.2.1. Operacionalización de variables

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR Cd MEDIANTE GFAAS EN CACAO (<i>THEOBROMA CACAO</i>)”				
Variable dependiente: cuantificación de niveles de Cd en almendras de cacao				
CONCEPTUALIZACIÓN	SUBCATEGORÍA	CATEGORÍA	INDICADORES	MÉTODOS Y TÉCNICAS
Cantidad de niveles de Cd presentes en el cacao.	Validación del método analítico.	Método de espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.	Concentración de Cd en el cacao.	Lecturas de absorción de niveles de Cd en el cacao.

VARIABLE INDEPENDIENTE: Longitud de onda.			
CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍA	INDICADORES	MÉTODOS Y TÉCNICAS
Es la distancia entre dos puntos consecutivos de una onda.	Longitud de onda determinada para determinar Cd en cacao.	Curvas de calibración Parámetros de validación: Datos de exactitud Rangos de error Límites de detección y cuantificación.	Lámpara de cátodo hueco de Cd

2.2.2. *Matriz de consistencia*

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES
<p>Problema general: Chávez Solutions ambiental no posee una metodología mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito validado para la determinación de metales pesados en alimentos.</p>	<p>Objetivo general:</p> <ul style="list-style-type: none"> Validar el método para la determinación de metales pesados (Cd), mediante GFAAS en cacao para el laboratorio CHÁVEZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda. 	<p>Hipótesis El método empleado en la determinación de niveles de Cd en el cacao cumple todos los parámetros de validación sujetos a normas estandarizadas.</p>	<p>Variable dependiente: Cuantificación de niveles de Cd en almendras de cacao.</p>
	<p>Objetivos específicos Verificar la metodología analítica empleando el equipo de absorción atómica con horno de grafito para la validación de metales pesados (Cd) en alimentos. Comprobar si cumple normas nacionales e internacionales para el consumo – venta y comercialización de cacao. Cumplir con los objetivos de validación planteados en el Laboratorio Chávez Solutions mediante un informe para acreditar el método de análisis de metales en matrices de alimentos.</p>	<p>Hipótesis específicas El equipo de horno de grafito servirá para la validación de Cd en cacao. La metodología desarrollada en base a la guía AOACC 999.11 será factible para determinar Cd en cacao.</p>	<p>Variable independiente: Longitud de onda.</p>

2.3. Tipo y diseño de investigación.

2.3.1. Tipo de investigación

Para la validación de métodos el tipo de investigación que se ha utilizado es teórica – experimental. La parte teórica desarrollándose a través de investigaciones bibliográficas de métodos, guías, normativas oficiales en especial las normativas europeas, publicaciones, temas afines encontrados en libros, páginas web y procedimientos de validación.

La parte experimental se realizó en el área instrumental del Laboratorio Chávez Solutions con los equipos, materiales y reactivos que posee el mismo. Obteniendo datos de cuantificación de Cadmio en cacao a diferentes niveles, para validar el método de espectrometría de absorción atómica electro térmico (Horno de grafito) en el análisis de Cadmio en cacao. El procedimiento de validación de los metales se basó en el instructivo guía de laboratorio para la Validación de Métodos PEE82.

En el procedimiento experimental se realizará 3 curvas de calibración por cada día, determinando las concentraciones reales a diferentes niveles, estándares y fortificados de las muestras.

Finalmente se registrará los resultados obtenidos de acuerdo a cada nivel el registro de los resultados para cada grupo de ensayos de acuerdo al protocolo del laboratorio para determinación de metales pesados en alimentos.

- Según el tipo de inferencia la investigación corresponde a una investigación de tipo hipotética deductiva ya que se obtendrá las conclusiones a partir de los datos obtenidos.
- Según la profundización del objeto de estudio la investigación corresponde a una investigación teórica - aplicada ya que se validará el método para determinar Cd en cacao basados en guías u otras referencias bibliográficas.
- Según el periodo temporal corresponda a una investigación de corte transversal debido a que está relacionado a un tiempo determinado para la validación del método.
- Según la manipulación de variables corresponde a una investigación experimental debido a que se tiene control sobre las variables que ayuden a determinar los límites de cuantificación y detección.
- Según la condición de estudio corresponde a una investigación de laboratorio, puesto que los análisis se los realizará en el laboratorio.

Según el método de investigación corresponde a una investigación mixta ya que la validación de métodos abarca análisis cuantitativos y cualitativos.

2.3.2. *Diseño de la investigación*

2.3.3. *Diseño experimental*

El diseño de investigación que se va a emplear es de tipo experimental, desarrollándose en el laboratorio CHAVÉZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda. Usando equipos, materiales, reactivos adquiridos en la empresa. El diseño experimental empleado en la investigación se puede resumir de la siguiente manera:

Tabla 1-2: Esquema de diseño experimental

Esquema general del diseño experimental utilizado en la VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR Cd MEDIANTE GFAAS EN CACAO (<i>THEOBROMA CACAO</i>)	
Diseño experimental	
"Muestras" o elementos de las que se dispone para la validación y Determinación de la exactitud del método (% de recuperación)	Estándares de Calibración de CADMIO PQ-A-09, a partir del cual se prepara un patrón de trabajo de 100 ug/L Preparación de estándares de 1 ug/L, 2 ug/L, 4 ug/L, 6 ug/L, 8 ug/L y 10 ug/L a partir del patrón de trabajo. Para verificación de curva en: Punto bajo 1,5 mg/L, criterio de aceptación 100±15. Punto alto 9 mg/L, criterio de aceptación 100±10. Para determinación de la exactitud se utilizan Materiales de Referencia y adición de patrón en matriz de Cacao. Se procederá a leer 3 veces por cada día la curva de calibración
Submuestras (Unidades que se procesan por día)	Patrones de trabajo, preparadas cada día en condiciones de repetibilidad, lo que supone un total: 6 blancos reactivos 6 muestras de trabajo nivel bajo con adición de patrón 6 muestras de trabajo nivel medio con adición de patrón 6 muestras de trabajo nivel alto con adición de patrón 2 materiales de Referencia
Procesamiento Repetibilidad/ Reproducibilidad	Repetición de análisis cada día (en condiciones de repetibilidad) que seguirán el método completo. Reproducir el trabajo por 3 días en cada matriz.
Lectura	Lectura de Absorbancias en espectrofotómetro Horno de grafito HGA 800 Perkin Elmer
Función de respuesta (Linealidad)	Obtenida cada día por regresión lineal con las parejas de X valores asignados y Y lecturas obtenidas de patrones ($L=mP+Lo$). Determinación diaria del grado de ajuste (r^2) y de los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión y la región de confianza de

	la función de respuesta. Determinación de la función de respuesta media de los 3 días y sus intervalos de confianza.
Interpolación y Cálculos	Interpolación, en la recta global de las lecturas obtenidas de los procesados de las matrices, MRC y Patrones añadidos.
Tratamiento estadístico	Análisis de varianza de un solo factor de los resultados obtenidos para determinación de la precisión por concentración. Determinación de la exactitud (% de recuperación y Material de Referencia). Obtención de los límites de detección y de cuantificación del intervalo de trabajo y la incertidumbre asociada a cada matriz.

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions. Criterios SAE.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Tabla 2-2: Modelo para recolección de datos de una muestra de alimentos que contiene Cd.

Nivel de muestreo	Día 1	Día 2	Día 3
Cacao sin fortificar	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6
Cacao fortificado nivel Bajo	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6
Cacao fortificado nivel Medio	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6
Cacao fortificado nivel Alto	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6	R1, R2, R3, R4, R5, R6

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Una vez obtenido los datos se procederá a construir cálculos en Excel para determinar análisis de repetibilidad (% SDR), análisis de reproducibilidad (t student, % Recuperación), Análisis de Varianza (T Fisher) y el dato de incertidumbre para su posterior análisis estadístico y su conclusión para la verificación del cumplimiento para la validación del método.

2.3.4. Localización del estudio

La Validación de metales pesados por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito, se realizará en el Laboratorio CHÁVEZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda., ubicado en la Provincia de Pichincha, Ciudad de Quito, Urbanización San Fernando, Ignacio Asín N52-27 y Antonio Román.

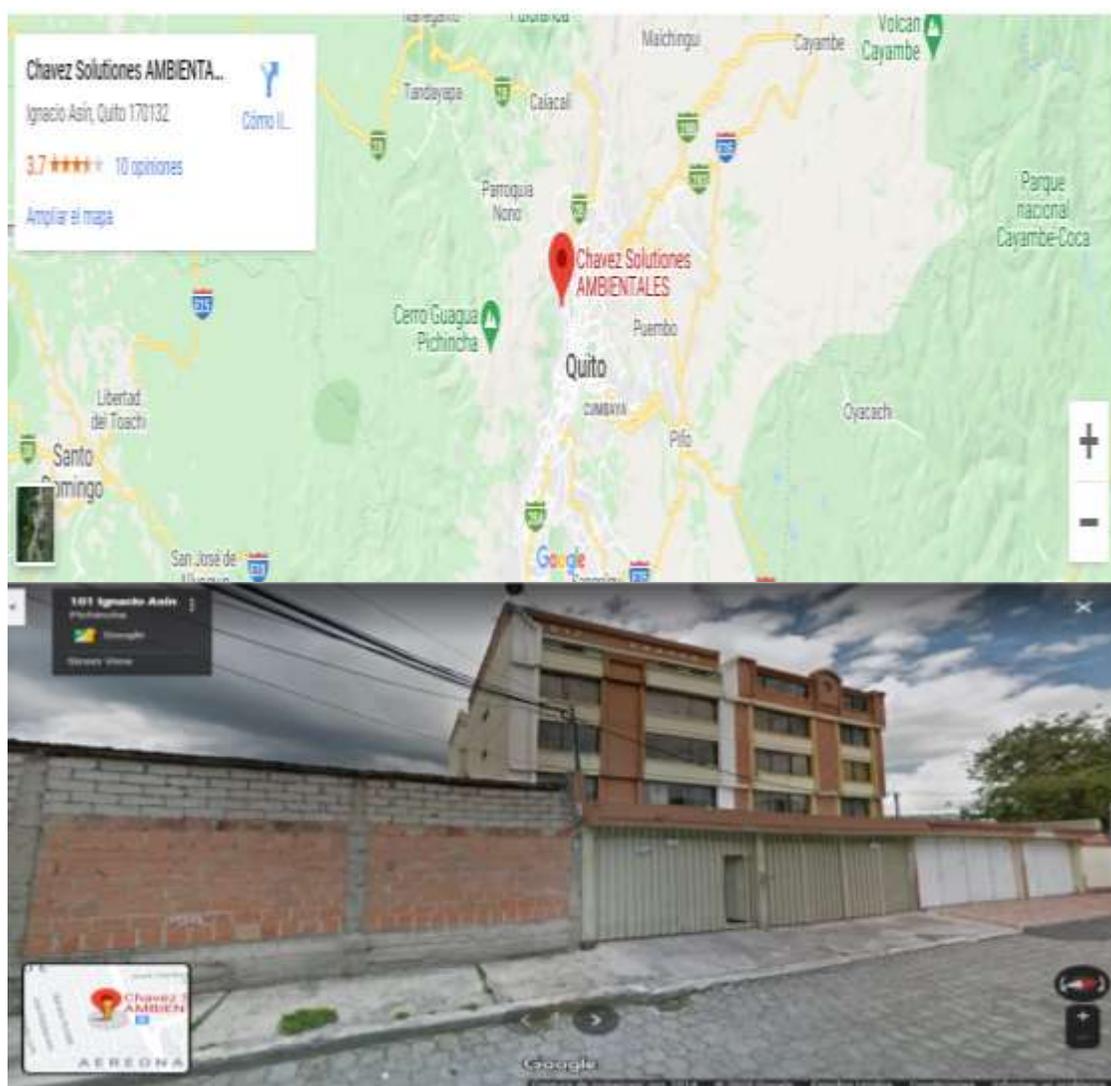


Figura 1-2. Localización del Laboratorio CHÁVEZ SOLUTIONS

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

2.3.5. Unidad de análisis

Metal pesado: Cadmio

2.3.6. Población de estudio

Almendras de cacao que contienen metales pesados (cadmio) este producto se encuentra en la Costa y Amazonía.

Cacao orgánico.

Materiales de referencia certificados.

2.3.7. Tamaño de muestra

En la investigación que se llevó a cabo con un tamaño de muestra con población finita (9 muestras de cacao de diferentes procedencias: Costa, Sierra y Amazonía usadas en la caracterización; 72 ejemplares usados en la validación; 2 materiales de referencia durante los 3 días que suponen 6 lecturas), en donde los parámetros de interés pueden ser la media, desviación estándar, rango por tanto se emplearan tratamientos estadísticos como: coeficiente de variación, ANOVA, criterio Fisher, T Student, % de Recuperabilidad, estimación de incertidumbre.

Se realizará con matrices de cacao donde se procederá a repetir 6 veces cada nivel blanco, bajo medio y alto por tres días y 2 analistas.

Para la curva de calibración se empleará estándares madres a partir del cual se prepara para los puntos de calibración características y rangos lineales emitidos por las guías. Muestras de almendras de cacao orgánicas.

2.4. Selección de muestra

2.4.1. Método

2.4.1.1. Preparación de curva de calibración

Preparar el agua acidulada para aforar las soluciones estándar en un balón de aforo de 1000 mL, colocar aproximadamente 100 mL de agua destilada tipo II.

Con una pipeta medir 1,5 mL de ácido nítrico concentrado libre de trazas de marca Fisher Chemical y añadir en el balón calibrado de 1000 mL

Aforar hasta la marca con agua destilada, tapar y agitar bien, aproximadamente durante 1 minuto.

Modificador de matriz: La preparación del modificador consistió en pesar 2,42 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (fosfato de amonio) y 0,1729 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (nitrato de magnesio hexahidratado), los cuales se transfirieron a un matraz de 100 mL y se aforo con agua acidulada.

Una vez realizada el agua acidulada y modificador de matriz, se procede a la preparación de la solución madre: en un balón volumétrico de 100 mL colocar 1 mL del patrón de Cadmio 1000 mg/L, aforar con el agua acidulada y agitar durante 1 minuto. Dicha solución tiene una concentración de 10 mg/L.

Tomar 10 mL de la solución de concentración de 10 mg/L y aforar con agua acidulada en un balón volumétrico de 100 mL. Dicha solución tiene una concentración de 1000 ug/L.

Tomar 10 mL de la solución de concentración de 1000 ug/L y aforar con agua acidulada en un balón volumétrico de 100 mL. Este estándar tiene una concentración de 100 ug/L que será usada para preparar la curva de calibración.

A partir de la solución 100 ug/L se preparan las soluciones estándar para la construcción de la curva a continuación se muestra la expresión para el cálculo de las alícuotas.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

Tabla 3-2: Preparación de curva de calibración a partir de estándar madre 100 ug/L.

A partir del estándar de 100 ug/L			
Concentración (ug/L)	Vol. Alícuota (mL)	Vol. Aforo (mL)	Modificador de matriz (mL)
1	0.5	50	2
2	1	50	2
4	2	50	2
6	3	50	2
8	4	50	2
10	5	50	2
Control de calidad			
1.5	0.75	50	2
9	4.5	50	2

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Nota: para tener un mejor aforo trasvasar el agua acidulada a un vaso de precipitación y aforar con pipetas pasteur.

2.4.1.2. Preparación de muestras

a) Preparación de muestras de caracterización

Poner a secar las almendras de cacao exponiendo a sol sin dejar que se moje por ningún motivo.

Colocar las almendras de cacao sobre un sartén para que sea fácil sacar la cascara que le protege a la almendra. Moler la almendra de cacao, hasta obtener en polvo y poder homogenizar de la mejor manera.

Pesar en una balanza analítica 9 muestras de polvo de cacao de diferentes procedencias (costa, oriente, cacao orgánico), 1 gramo de cada muestra.

Llevar sobre una plancha para la pre calcinación de las muestras.

Una vez que estén precalcificados, llevar a la mufla durante 4 horas a 550°C, dejar que se enfríe, y sacar de la mufla.

Añadir 10 mL de agua acidulada a la muestra calcinada, calentar en la plancha durante 2 minutos después de que empieza a ebulir, dejar enfriar.

Filtrar en balones de 50 mL mediante papel filtro de 0.45 μ m las muestras digeridas, añadir 2 mL de modificador de matriz y aforar con agua acidulada en el balón de 50 mL.

Colocar las muestras filtradas en envases estériles, y codificarlos.

Prender el equipo de absorción atómica, elegir el método de la lectura, colocar las muestras en los viales, alinear el equipo, verificar la curva de calibración y proceder a la lectura de las muestras.

Sacar el promedio de los metales que contiene cada una de las muestras para elegir la muestra que contenga menor cantidad de metal.

b) Preparación de muestras fortificadas

Seguir todos los pasos anteriores de la caracterización. Sin embargo, la fortificación se debe realizar antes de la pre calcinación de las muestras. Una vez elegida la muestra con la cual se va a trabajar, proceder a realizar los cálculos para las fortificaciones de la siguiente manera:

Solución estándar 1000 μ g/L es equivalente a 1 mg/L o 1 μ g/mL

Peso de la muestra 1 g

Calculo para fortificar a nivel bajo (0,5 mg/kg o 0,5 μ g/g)

$$\frac{0.5 \text{ ug}}{1 \text{ g}} * \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ ug}} * 1 \text{ g} = 0,5 \text{ mL}$$

Calculo para fortificar a nivel medio (1 mg/kg o 1 ug/g)

$$\frac{1 \text{ ug}}{1 \text{ g}} * \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ ug}} * 1 \text{ g} = 1 \text{ mL}$$

Calculo para fortificar a nivel alto (2 mg/kg o 2 ug/g)

$$\frac{2 \text{ ug}}{1 \text{ g}} * \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ ug}} * 1 \text{ g} = 2 \text{ mL}$$

El patrón químico usado es de marca AccuStandard, este es un compuesto de Cd²⁺ en 2-5% de HNO₃

2.5. Análisis instrumental

Para el análisis del metal en el horno de grafito se debe proceder de la siguiente manera:

Abrir el gas de nitrógeno extra puro, encender el computador y el equipo de horno de grafito, la lámpara de cátodo hueco que se usara es de marca Perkin Elmer de Cd a una longitud de onda de 228.8 nm.

Ingresar los datos en el programa WinLab 32, la lectura se realiza en 5 pasos que se encuentra programado en el equipo de la siguiente manera:

Tabla 4-2: Programa de Horno de Grafito para Cadmio.

<i>Temp °C</i>	<i>Ramp Time</i>	<i>Hold Time</i>	<i>Internal Flow</i>	<i>Gas Type</i>
110	1	30	250	Normal
130	15	20	250	Normal
850	10	20	250	Normal
1650	0	5	0	Normal
2600	1	5	250	Normal

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Injection Temperatura: 50°C

2.5.1. Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica, perkin Elmer acoplado al horno de grafito HGA 800
- Lámpara de cátodo hueco Perkin Elmer Cadmio

Materiales

- Balones aforados de 10, 50, 25 y 1000 ml.
- Pipeta volumétrica clase A: 1; 5; 10; 20; 25 mL
- Papel filtro de 0,45 um

Reactivos

- Nitrógeno extra puro
- Agua destilada grado II con conductividad <1 uS/cm
- Ácido nítrico
- Patrón químico Cadmio
- Fosfato de amonio
- Nitrato de magnesio hexahidratado

2.6. Técnicas de recolección de datos

El Laboratorio CHAVEZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda. En la validación de métodos analíticos registra los datos obtenidos en documentos de Excel para su posterior tratamiento estadístico de acuerdo a cada una de las necesidades de los métodos a validarse.

2.6.1. Objetivos y parámetros de validación

Para iniciar con la parte experimental de la validación del método para determinar los metales pesados en alimentos, primero se propone objetivos y metas claras hacia donde se desea llegar para cumplir con el plan de validación analítica de métodos.

Tabla 5-2: Objetivo y criterio de aceptación para la validación del método analítico.

OBJETIVO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN		
PARÁMETRO A VALIDAR	OBJETIVO	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO
SELECTIVIDAD / ESPECIFICIDAD	Conocimiento de interferencias según el método.	NO APLICA
LINEALIDAD/FUNCIÓN DE RESPUESTA	Regresión lineal. Grado de ajuste $r^2 \geq 0,995$. Se determinará los coeficientes de regresión y sus intervalos de confianza al 95 %.	Regresión Lineal
PRECISION (REPETIBILIDAD y REPRODUCIBILIDAD)	% CVr < 15 % en todos los niveles % CVR < 15 % en todos los niveles	Análisis de Varianzas
LIMITE DE CUANTIFICACION	$\leq 1,10 \text{ mg/kg}$ (%U $\leq 30\%$, P=95 %)	Exactitud y Precisión
LIMITE DE DETECCIÓN	0,84 mg/Kg	Linealidad
EXACTITUD	Porcentaje de recuperación entre 80 - 120%	Análisis MR
RANGO DE TRABAJO	0.5 mg/Kg a 2 mg/Kg	Tratamiento Estadístico
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA	$U \leq 33\%$ en todos los niveles con intervalo de confianza de al menos el 95.45%.	Incertidumbre del Método

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

CAPÍTULO III

3. OBTENCIÓN DE RESULTADOS

3.1. Caracterización de muestras de cacao

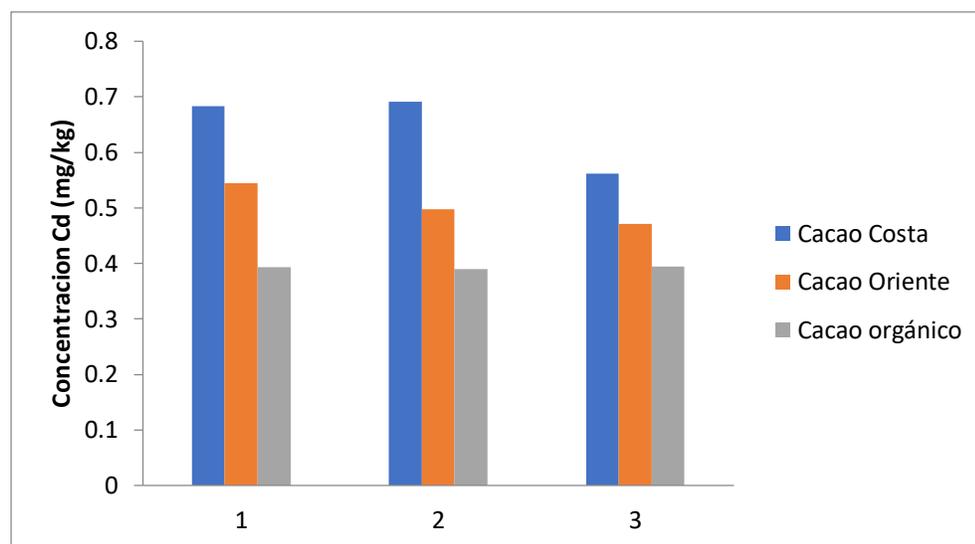


Gráfico 1-3: Lectura de caracterización de muestras de cacao.

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Tabla 1-3: Promedio de concentraciones de Cd en diferentes muestras de cacao.

	Cacao Costa	Cacao Oriente	Cacao orgánico
	0,683	0,545	0,393
	0,691	0,497	0,390
	0,562	0,471	0,394
Promedio =	0,645	0,504	0,392
Desviación Estándar =	0,072	0,038	0,002
CV (%)	11.2	7.4	0.53

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

El mayor valor en almendras se registra en muestras de cacao obtenidas de la Costa provincia de Los Ríos, cantón Vinces con un promedio de 0,645 ppb de Cd y en el cacao de la Amazonía oscila una concentración de 0,504 ppb de Cd ubicada en la provincia de Pastaza, parroquia Puyo. El menor valor de concentración de Cd fue de 0,392 ppm de Cd halladas en un cacao orgánico adquirido en la provincia de Pichincha en una tienda de productos orgánicos denominado Camarí. Los valores antes mencionados se encuentran por debajo del límite máximo residual permitido por el REGLAMENTO (UE) No 488/2014, donde la concentración de Cd en cacao es de 1 mg/kg, en lo que respecta a las almendras de cacao, para sus derivados constan otros valores. El Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) en el año 2019 ha generado procesos de certificaciones para que los laboratorios a nivel nacional puedan ofertar este servicio: “Determinar Cd en cacao y sus derivados”, cumpliendo con normativas reglamentarias en base al CODEX ALIMENTARIUS de la unión europea de esta manera brindando la confianza y la apertura de este producto a mercados internacionales.

El protocolo de validación de métodos de la unión europea nos dice que se debe de realizar fortificaciones a nivel superior, medio y bajo. Por ende, se procedió a trabajar en la validación con el cacao orgánico.

Dichos valores varían por varios factores estos pueden ser: ubicación geográfica, uso de fertilizantes. En la costa se tiene conocimiento que posee mayor concentración de metales en los suelos y el agua utilizada para las plantaciones de cacao debido a la presencia de industrias que emiten dichos metales al ambiente. En la Amazonía se conoce que la contaminación de este metal se encuentra en menor proporción, sin embargo, el aroma no es similar al de la costa. En el cacao orgánico se deduce que no existe gran utilización de agroquímicos por ende presenta menos concentración de Cd.

3.2. Datos de validación

3.2.1. Ensayo de curva de calibración

Tabla 2-3: Estudio realizado con promedios y % de recuperaciones.

PQ (ug/L)	[]			%R			X (%Rec)	s (%Rec)
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3		
1,00	1.12	1.11	1.11	112	111	111	111	0,728651304
2,00	2.15	2.20	2.19	108	110	110	109	1,223923508
4,00	4.31	4.26	4.20	108	107	105	106	1,486821953
6,00	6.13	6.10	6.13	102	102	102	102	0,347554625
8,00	7.90	7.84	7.89	99	98	99	98	0,397014675
10,00	9.74	9.69	10.15	97	97	102	99	2,537757657
Control de calidad								
1,50	1.47	1.53	1.57	98	102	104	101	3,14991759
9,00	9,26	9,09	9,25	103	101	103	102	1,028801253

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Donde:

P.Q.: Patrón químico de los puntos de calibración; []: Concentración promedio de los puntos de calibración de diferentes días (ug/L); %R: Porcentaje de recuperación en base a los promedios de concentración; X: promedio en base al % de recuperación; S: desviación estándar en base al % de recuperación.

Interpretación y Análisis

Se observa en la tabla las concentraciones promedio en ug/L de los estándares usados en la curva de calibración que se calculó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro menos el intercepto y dividido para la pendiente. Este cálculo se realiza para cada uno de los patrones químicos usados en la validación, luego se procede a calcular los porcentajes de recuperación. Este se calcula el valor obtenido real dividido para el valor teórico y multiplicando por 100 para cada uno de los niveles y días. En la tabla se evidencia que todos los puntos de calibración cumplen con los objetivos de validación donde propuso una recuperación de $100 \pm 20\%$ además la desviación estándar de las recuperaciones es menor a 3.

Tabla 3-3: Estudio realizado con promedios y % de recuperaciones.

Muestra (mg/Kg)	[]			%R			X (%Rec)	s (%Rec)
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3		
Cacao fortificado 0,5	0.51	0.51	0.50	102	102	100	101	1.154700538
Cacao fortificado 1	1.01	1.01	1.02	101	101	102	101	0.577350269
Cacao fortificado 2	2.03	2.11	2.04	102	106	102	103	2.179449472

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Donde:

[]: Concentración promedio de los puntos de calibración de diferentes días (mg/kg); %R: Porcentaje de recuperación en base a los promedios de concentración; X: promedio en base al % de recuperación; S: desviación estándar en base al % de recuperación.

Interpretación y Análisis

En la tabla se aprecia las concentraciones promedio en mg/kg de las muestras analizadas en la validación.

El equipo nos da los resultados de la absorbancia. El primer paso para el cálculo del valor en ug/L se derivó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro menos el intercepto y divido para la pendiente. Para el cálculo de la concentración en mg/kg de las muestras se prosigue de la siguiente manera: el cacao sin fortificar solo se calcula la media y la desviación estándar.

Para el cacao fortificado se procede a multiplicar el valor obtenido en ug/L por el factor de dilución (FD) para el nivel 0.5 y 1 es de 2 mientras que para el nivel 2 el FD es de 4. La concentración en ug/L obtenida se lo multiplica por el volumen de aforo (50 mL) y el FD todo se divide para la masa (1 g aproximado) y para 1000 donde se obtiene la concentración en mg/kg. La concentración obtenida para los niveles de 0.5; 1; 2 se procede a restar de los blancos (cacao sin fortificar), esto para obtener el valor real.

Para el caculo de los porcentajes de recuperación se aplica la siguiente ecuación:

$$\%Recuperación = \frac{\text{valor real}}{\text{valor teórico}} * 100\%$$

En cada uno de los niveles fortificados y días se evidencia en la tabla % de recuperación de 101, 101, 103 respectivamente esto quiere decir que cumple con los objetivos de validación propuestos en un rango de $100 \pm 20\%$ además la desviación estándar de las recuperaciones es menor a 3.

3.3. Linealidad

Se procedió a preparar soluciones estándares de 1, 2, 4, 6, 8, 10 ppb o ug/L a partir de la solución madre de 100 ug/L, donde se tomaron datos de 3 repeticiones por cada día de esta manera obtienen la función respuesta del método:

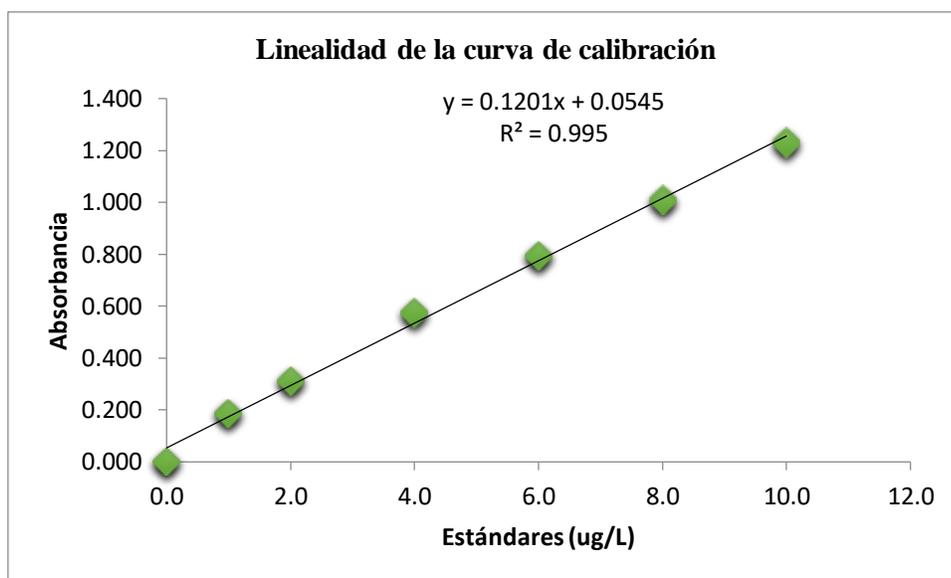


Gráfico 2-3: Curva de calibración día 1 absorbancia vs concentración.

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

Se observa que el rango lineal está dado de 0-10 ppb, dando como resultado un coeficiente de regresión lineal es de 0,995 el cual se considera aceptable, es decir, el método es válido pues no se evidencian dispersión dentro de los blancos propuestos para análisis.

Al aplicar los cálculos respectivos en especial la de los mínimos cuadrados se obtiene la función respuesta y estimación lineal del método los cuales se describen a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 4-3: Parámetros estadísticos función-respuesta de las curvas de calibraciones.

Variable	Día 1	Día 2	Día 3
Pendiente (b)	0.1201	0.1193	0.1234

Intercepto (a)	0.0545	0.0553	0.0452
Sb	0.0006658	0.0025794	0
Sa	0.0016166	0.0006245	0.0005508
Syx	0.054	0.054	0.045
r ²	0.995	0.995	0.9967
a mín	0.0562	0.0532	0.0449
a máx	0.053	0.0582	0.0459
b mín	0.1197	0.1186	0.1234
b máx	0.1209	0.1198	0.1234
Sxy	0.44	0.45	0.36
R	0.997	0.997	0.998

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Donde:

Sb: desviación estándar de la pendiente; Sa: desviación estándar del intercepto; Syx: desviación estándar de Y en función de X; Sxy: desviación estándar de X en función de Y

Interpretación y Análisis

De los valores obtenidos en la tabla anterior se procede a tomar para el control de las curvas de calibración durante y después del proceso de validación de esta manera el intercepto máximo corresponde a 0.0582 y como mínimo 0.0449 del mismo se obtiene la pendiente con un valor máximo de 0.1234 y el mínimo de 0.1186. Estos valores son referencia para los análisis posteriores en donde no se puede sobrepasar los valores máximos u obtener valores inferiores al mínimo de la pendiente e intercepto. Si no se obtiene valores dentro de los rangos antes mencionados pese a que el coeficiente de regresión lineal este mayor a 0.995 el análisis no es correcto.

Basándose en la tabla de acuerdo a r² el tercer día será el mejor, sin embargo, como es una validación se calcula los promedios de los tres días para encontrar los límites de control para posteriores análisis.

3.4. Repetibilidad

Tabla 5-3: Repetibilidad de datos de Cd en cacao a diferentes niveles.

Muestra	Nivel	Gmax (3,5 alfa 0.05) Gtab (0.683)	Sr	% CVr ó % SRD
Cacao sin fortificar	0,0	0,4957	0,00	1
Cacao fortificado 0,5	0,5	0,5847	0,01	1
Cacao fortificado 1	1,0	0,6206	0,01	1
Cacao fortificado 2	2,0	0,4703	0,06	3

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Donde:

%CVr: coeficiente de variación en base a la repetibilidad.

Interpretación y Análisis

Si el valor de Gmáx es menor a la G tab quiere decir que las varianzas son homogéneas por ende se procede a calcular la repetibilidad de los datos, donde el %CVr es menor al 15% de esta manera se concluye que no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos en la validación.

La Gtab se encuentra en las tablas de Cochran donde $K=5$, $n=3$ y $\alpha=0.05$

Tabla 6-3: Repetibilidad de datos para la curva de calibración.

Nivel	Sr	Gmax (2,3 alfa 0.05) Gtab (0.9750)	%CVr o % SRD
1,0	0,0251	0.5904	2,26
2,0	0,0237	0.3784	1,09
4,0	0,0385	0.5282	0,90
6,0	0,0356	0.4551	0,58
8,0	0,0378	0.6596	0,48
10,0	0,0526	0.4027	0,53
Control de calidad			
1,50	0,0679	0.6563	4,46
9,0	0,0663	0.4473	0,72

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

Si el valor de G_{\max} es menor a la G_{tab} quiere decir que las varianzas son homogéneas por ende se procede a calcular la repetibilidad de los datos, donde el %CvR es menor al 15% de esta manera se concluye que no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos en la validación.

La G_{tab} se encuentra en las tablas de Cochran donde $K=2$, $n=3$ y $\alpha=0.05$

3.5. Reproducibilidad

Tabla 7-3: Análisis estadístico de Cd en cacao respecto a reproducibilidad.

Muestra	Nivel	S_R	% CvR ó %SRD
Cacao sin fortificar	0,0	0,0034	1
Cacao fortificado 0,5	0,5	0,0056	1
Cacao fortificado 1	1,0	0,0106	1
Cacao fortificado 2	2,0	0,0676	3

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Donde:

SR: media de reproducibilidad; %CvR: coeficiente de variación en base a la reproducibilidad.

Interpretación y Análisis

Se realizó el análisis respectivo para la verificación de la reproducibilidad de los datos en función del %CvR que es menor a 15 de este modo se dice que no existe diferencia entre los datos tomados a diferentes niveles en la validación.

Para la repetibilidad y reproducibilidad los coeficientes de variación tienen que ser siempre menores a 15% para que el método pueda ser declarado como válido según el SAE.

Tabla 8-3: Análisis estadístico de la curva de calibración.

Nivel	S_R	% RSD
0,0	0,0000	
1,0	0,0251	2,26
2,0	0,0312	1,43
4,0	0,0673	1,58

6,0	0,0358	0,58
8,0	0,0443	0,56
10,0	0,2574	2,61
Control de calidad		
1,50	0,0728	4,79
9,0	0,1072	1,17

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Donde:

SR: media de reproducibilidad; %CvR: coeficiente de variación en base a la reproducibilidad.

Interpretación y Análisis

Se realizó el análisis respectivo para la verificación de la reproducibilidad de los datos en función del %CvR que es menor a 15 de este modo se dice que no existe diferencia entre los datos tomados en la curva de calibración.

3.6. Análisis de varianza

Tabla 9-3: Resultados de todos los estándares de Cd en la curva de calibración.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Estándar 1 ppb						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,66667E-06	2	2,33333E-06	0,2530	0,7843	5,143
Dentro de los grupos	5,53333E-05	6	9,22222E-06			
Total	6E-05	8				
Estándar 2 ppb						
Entre grupos	5,26667E-05	2	2,63333E-05	3,2027	0,1131	5,143
Dentro de los grupos	4,93333E-05	6	8,22222E-06			
Total	0,000102	8				
Estándar 4 ppb						
Entre grupos	0,00031089	2	0,00015544	7,1744	0,0256	5,143
Dentro de los grupos	0,00013	6	2,1667E-05			

grupos						
Total	0,00044089	8				
Estándar 6 ppb						
Entre grupos	3,8222E-05	2	1,9111E-05	1,0299	0,41254182	5,143
Dentro de los grupos	0,00011133	6	1,8556E-05			
Total	0,00014956	8				
Estándar 8 ppb						
Entre grupos	8,86667E-05	2	4,43333E-05	2,1223	0,200890061	5,143
Dentro de los grupos	0,000125333	6	2,08889E-05			
Total	0,000214	8				
Estándar 10 ppb						
Entre grupos	0,005660667	2	0,002830333	69,7890	7,00109E-05	5,143
Dentro de los grupos	0,000243333	6	4,05556E-05			
Total	0,005904	8				

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

Con la prueba F se usa para establecer significancia entre los grupos es decir si $F_{obs} < F_{crítico}$ no existe diferencia entre grupos por lo tanto se acepta las medidas y no afecta los objetivos de validación, pero si $F_{obs} > F_{tab}$ existe diferencia entre grupos. Sin embargo, para el estándar de 4 y 10 ppb existe diferencia entre grupos, esto puede ser por errores en la lectura o en la preparación del estándar.

Tabla 10-3: Análisis estadístico de varianza con respecto a Cd en cacao.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Cacao sin fortificar						
Entre grupos	7,6575E-05	2	3,8288E-05	6,50606926	0,0092382	3,68232034
Dentro de los grupos	8,8274E-05	15	5,8849E-06			
Total	0,00016485	17				
Cacao fortificado 0.5						
Entre grupos	2,763E-05	2	1,3815E-05	0,4474321	0,64752759	3,68232034
Dentro de los grupos	0,00046315	15	3,0877E-05			
Total	0,00049078	17				
Cacao fortificado 1						
Entre grupos	0,00097917	2	0,00048958	13,5315509	0,00043795	3,68232034
Dentro de los grupos	0,00054271	15	3,6181E-05			
Total	0,00152188	17				
Cacao fortificado 2						
Entre grupos	0,02142263	2	0,01071132	3,20546844	0,06932931	3,68232034
Dentro de los grupos	0,05012364	15	0,00334158			
Total	0,07154628	17				

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

Se usa la prueba F para establecer significancia entre los grupos es decir si $F_{obs} < F_{crítico}$ no existe diferencia entre grupos por lo tanto se acepta las medidas y no afecta los objetivos de validación, pero si $F_{obs} > F_{tab}$ existe diferencia entre grupos. Sin embargo, para el cacao sin fortificar, para el fortificado de nivel 1 existen diferencias entre grupos, pero esto no afecta al objetivo de validación.

3.7. Incertidumbre

3.7.1. Material de vidrio

Se reemplazo todas las variables para el cálculo de las incertidumbres en los materiales usados para los instrumentos volumétricos (balones, pipetas, bureta) se realizó con la siguiente fórmula:

$$u(V_f) = \sqrt{u(V_{cal})^2 + u(V_{temp})^2 + u(V_{rep})^2}$$

Para la balanza analítica se procede con la siguiente:

$$\mu PMuestra = \sqrt{(\mu Cal)^2 + (\mu Res)^2}$$

De esta manera se obtiene los consecuentes resultados:

Tabla 11-3: Estimación de la incertidumbre de material de vidrio.

Material	Incertidumbre
Balón 100 mL	0.072
Balón 50 mL	0.037
Balón 10 mL	0.009
Pipeta 100-1000 uL (0.50 mL)	0.280
Pipeta 100-1000 uL (1 mL)	0.340
Pipeta 100-1000 uL (2 mL)	0.680
Bureta 25 mL	0.0198
Balanza analítica	0.0002

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

Los datos obtenidos en la tabla son a partir de las calibraciones realizadas por laboratorios externos de esta manera tener la incertidumbre de los datos para la validación.

3.7.2. Calibración espectrofotómetro

La fórmula empleada en el cálculo de estimación incertidumbre del espectrofotómetro es la siguiente:

$$u_{cal} = \sqrt{(upp)^2 + (uFR)^2 + (ures)^2}$$

Y para la estimación incertidumbre patrón de calibración es realizada a partir de la consecuente ecuación, una vez aplicada todas las variaciones se resume en la subsiguiente tabla:

$$STD = C1 * \frac{V_{pipeta}}{V_{matraz}}$$

$$\mu_{std} = STD * \sqrt{\left(\frac{\mu C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\mu V_{pipeta}}{V_{pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{\mu V_{matraz}}{V_{matraz}}\right)^2}$$

Para el reemplazo de las incertidumbres función respuesta y de resolución se aplica las fórmulas descritas a continuación respectivamente:

$$u_{(FR)} = \frac{sPL}{\sqrt{n}}$$

$$u_{(resol)} = \frac{resolución}{\sqrt{12}}$$

Tabla 12-3: Incertidumbre de calibración.

	Punto calibración						Control de calidad	
incertidumbre	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	1,50	9,0
Upp	0,0461	0,0652	0,1130	0,1642	0,2164	2,663111667	0,0549	0,2427
uFR	0,0563							
Ures	0,0289							
Ucal	0,0783	0,0909	0,1295	0,1760	0,2255	2,6639	0,0838	0,2508
%u cal	7,8	4,5	3,2	2,9	2,8	2,8	5,6	2,8

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

$$uR(CADMIO) = \sqrt{(uCal)^2 + (uRes)^2 + (uR)^2 + (uExactitud)^2}$$

Donde:

U(cal): incertidumbre combinada de la calibración instrumental; U(res): incertidumbre de resolución (medida de absorbancia hay que convertir en concentración); U(R): incertidumbre de reproducibilidad (proviene de validación S_R); U(exactitud): incertidumbre de exactitud (proviene de recuperación S_{%Rec}).

Tabla 13-3: Datos obtenidos de la estimación de incertidumbre en la determinación de Cd.

	Puntos de medida en el ensayo						Control de calidad	
Incertidumbre	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10	1,5	9,0
Ucal	0,0783	0,0909	0,1295	0,1760	0,2255	0,2819	0,0838	0,2508

Ures	0,0289							
uR	0,00836	0,01040	0,02242	0,01192	0,01476	0,0858	0,02428	0,03575
u Exactitud	0,0022	0,0037	0,0047	0,0011	0,0013	0,0086	0,0103	0,0034
uCADMIO	0,0839	0,0962	0,1359	0,1789	0,2281	0,3083	0,0932	0,2568
%u CADMIO	8,4	4,8	3,4	3,0	2,9	3,1	6,2	2,9
U CADMIO	0,168	0,192	0,272	0,358	0,456	0,617	0,186	0,514
%U CADMIO	17	10	7	6	6	6	12	6

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

3.7.3. Estimación incertidumbre preparación patrón añadido.

Para el cálculo de la incertidumbre con respecto a los niveles de Cd en cacao incluido la adición del patrón se ejecutó las fórmulas mencionadas a continuación:

$$STD = C1 * \frac{V_{pipeta}}{V_{matraz}}$$

$$\mu_{std} = STD * \sqrt{\left(\frac{\mu C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\mu V_{pipeta}}{V_{pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{\mu V_{matraz}}{V_{matraz}}\right)^2}$$

Tabla 14-3: Incertidumbre de calibración Cd en cacao.

	Cacao		
Incertidumbre	0,5	1	2
Upp	0,0003	0,0003	0,0007
Ufr	0,0563	0,0563	0,0563
Ures	0,0289	0,0289	0,0289
Ucal	0,0633	0,0633	0,0633
%ucal	12,7	6,3	3,2

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Tabla 15-3: Estimación incertidumbre de Cd respecto a cacao.

	Cacao		
Incertidumbre	0,5	1	2
Ucal	0,0633	0,0633	0,0633
Ures	0,0289	0,0289	0,0289

uR	0,00185	0,0035	0,02253
u Exactitud	0,0010	0,0030	0,0070
uCADMIO	0,0696	0,070	0,0745
%u CADMIO	13,9	6,97	3,7
U CADMIO	0,139	0,139	0,149
%U CADMIO	28	14	7

Fuente: Laboratorio Chávez Solutions.

Realizado por: (Guamán, J. 2021).

Interpretación y Análisis

En los criterios de calidad respecto a la precisión, exactitud e incertidumbre se determinaron estadísticamente utilizando tratamientos como ANOVA, Fisher, Prueba de homogeneidad de varianzas.

Se establece los parámetros de recuperación para las muestras y las curvas de calibración en un margen de $100 \pm 20\%$ en lo que respecta a la repetibilidad y reproducibilidad se tiene valores inferiores al 10% para la incertidumbre se tiene valores menores a 33 % con $K=2$ en todos los niveles.

El rango de incertidumbre de este método esta entre 7-28% de esta manera determinando que la U del método para determinar Cd en cacao es de 28% debido a que comprende todo el rango del trabajo.

CONCLUSIONES

En efecto el método verificado en el Laboratorio CHÁVEZ SOLUTIONS AMBIENTALES Cía. Ltda., para determinar metales pesados (Cd) es buena gracias a la sensibilidad del equipo (espectrofotómetro acoplado al horno de grafito), utilizado en la validación del método ya que se determina la concentración del metal en mg/kg (ppb). Basándose en la metodología sistemática de AOAC 999.11 y el protocolo de validación de la unión europea se logra estandarizar el método. El cacao es un alimento de exportación, con la metodología validada el laboratorio puede brindar resultados fiables y seguros para la exportación y no sean rechazados al llegar a su destino.

Las muestras de cacao utilizadas en la validación cumplen con las normas nacionales e internacionales para su consumo – venta y comercialización. La norma internacional es el reglamento 488/2014 de la unión europea en la cual se basa la norma nacional NTE INEN 176 para el cacao. Los promedios de concentraciones obtenidas en las muestras de cacao de la costa, oriente y cacao orgánico fueron de: 0.645; 0.504; 0.392 mg/kg respectivamente. Es decir, no sobrepasan el límite máximo residual permitido en las normativas que es de 1 mg/kg en lo que respecta a las almendras, mientras que para el polvo de cacao es de 0.65 mg/kg. Sin embargo, estas normativas emiten otros valores para sus derivados.

Se cumplió con los objetivos de validación planteados por el laboratorio basados en la guía Eurachem y el protocolo de validación de métodos de la unión europea. Estos objetivos corresponden a la función: respuesta-linealidad del método donde se cumple el criterio de regresión mayor o igual a 0.995, el intercepto máximo corresponde a 0.0582 y como mínimo 0.0449 y para la pendiente con un valor máximo de 0.1234 y el mínimo de 0.1186. Los porcentajes de recuperación oscilan entre $100\pm 20\%$ la incertidumbre obtenida es menor a 33% en todos los aspectos de la resolución del equipo, material volumétrico, preparaciones de estándares y matrices declarando a la incertidumbre final con los siguientes datos: 28% para el nivel bajo (0.5mg/kg); 14% para el nivel medio (1mg/kg); y 7% para el nivel superior (2mg/kg). El porcentaje de desviación estándar fue menor a 10% por ende el método es válido tanto en repetibilidad como en reproducibilidad.

RECOMENDACIONES

- Utilizar ácido nítrico libre de trazas para evitar interferencias al momento de la lectura de las muestras.
- Buscar el cacao que contenga menor cantidad de concentración de metal debido a que en la validación se debe fortificar a nivel bajo, medio y alto basándose en los límites máximos residuales.
- Utilizar materiales de referencia adecuados a la matriz que se esté trabajando.
- Al momento de preparar los estándares realizar con bureta para disminuir los errores al momento de realizar la curva de calibración.
- Tener cuidado al momento de realizar cenizas en la muestra debido a que si contiene grasas esta puede salpicar y contaminar a las demás muestras.
- Dejar que se calcine totalmente a las muestras antes de introducir en la estufa.
- Se recomienda que el laboratorio tiene que hacer mantenimientos constantes de los equipos.

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ CASTILLO, Jennifer Nicole & CORAL CARRILLO, Katty. Límites de detección y apreciación de cu, ni, zn, cd en aguas, suelos y sedimentos de la Reserva Biológica Limoncocha para su validación analítica 2015-2017 (Proyecto de Investigación) (Tercer Nivel). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito - Ecuador. 2017. pp. 1-25. Consulta (2020-12-09). Disponible en: <https://1library.co/document/y8g24p5z-validacion-analiticos-determinacion-espectrofotometria-absorcion-arsenico-voltametrica-residuales.html>

ANECACAO. El cacao, uno de los más significativos símbolos de nuestro país. *ANECACAO* [en línea]. 2015. [Consulta: 09 de diciembre de 2020]. Disponible en: <http://www.anecacao.com/index.php/es/noticias/cacao-ecuadoriano-es-reconocido-como-producto-fino-de-aroma.html>.

ARAUJO ABAD, Lourdes Salomé & TAPIA, Wilson & VILLAMARÍN ORTIZ, Adrián. "Verificación del método analítico de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para la cuantificación de cadmio en almendra de cacao (*Theobroma cacao*)". La Granja, Revista Ciencias de la Vida [en línea], 2020 (Ecuador), 31 (1), pp. 2-20. [Consulta: 12 de diciembre 2020]. ISSN 1390-3799. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476062548004>

BEATY, R.D. y KERBER, J.D. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. 2. United States of American. THE PERKIN-ELMER CORPORATION, 2003. [Consulta: 12 de diciembre 2020]. pp. 2-12. Disponible: <https://www.iitk.ac.in/che/pdf/resources/AAS-GTA-reading-material.pdf>

CEFA. Cacao. *CEFA* [en línea]. 2015. [Consulta: 09 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://cefaecuador.org/productos/cacao/>.

CHAVEZ SOLUTIONS. CHAVEZ SOLUTIONS Laboratorio Ambiental y Consultoría [en línea]. 2020. Disponible en: <https://chavezsolutions.com/>.

COMISIÓN EUROPEA. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal* [en

línea], 2014, (Unión Europea) 2, pp. 4. [Consulta: 12 de diciembre 2020]. ISSN 18314732. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281935185_Statement_on_tolerable_weekly_intake_for_cadmium_1_EFSA_Panel_on_Contaminants_in_the_Food_Chain_CONTAM

DETERMINACIÓN DE METALES POR ABSORCIÓN ATÓMICA - HORNO DE GRAFITO. *Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría.* [en línea], [Consulta: 12 de enero 2021]. 2016. Disponible en: <https://www.ugr.es/~fgil/proyecto/grafito/procedimiento.html>.

EUROLAB ESPAÑA P.P Y COLABORADORES. *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados.* [Consulta: 12 de enero de 2021]. 2016. S.l.: s.n. ISBN 9789187461590. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

FIALLOS MORALES, Maura Cristina. Cuantificación de metales pesados y calidad microbiológica de frutas y vegetales que se expenden en el mercado Mayorista de la ciudad de Ambato [en línea]. (Trabajo de titulación) (Tercer Nivel). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ambato - Ecuador. 2017. pp. 1-62. [Consulta: 28 de enero de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/25296>.

GORAYMI. Sabores del cacao fino de aroma. GoRaymi [en línea]. 2020. [Consulta: 28 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.goraymi.com/es-ec/zamora-chinchi/zamora/denominaciones-origen/sabores-cacao-fino-aroma-a6898baf>.

HERNÁNDEZ, Rosa, BRAVO, Lola, MORÓN, Dulce, ARMAS, A., GIRÓN, Blanca, & APONTE, Carlos. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel [en línea]. vol. 48, pp. 1-14. [Consulta: 28 de enero de 2021]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_serial&pid=0798-0477&lng=pt

ISO / IEC 17025 : 2005, 2005. NORMA INTERNACIONAL Iso / Iec 17025 : 2005. *Quality.* S.l.:

PÉREZ GARCÍA, Perla Esmeralda, & AZCONA CRUZ, María Isabel. Los efectos del cadmio en la salud. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas [en línea]. 2012., vol. 17, no. 3, pp.

199-205. ISSN 1665-7330. [Consulta: 28 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/473/47324564010.pdf>

REISANCHO REISANCHO, Lidia Alexandra. Implementación De Un Sistema De Validación De Métodos Físico-Químicos Para Análisis De: Aceites Y Grasas, Cloruros, Fósforo Total Y Nitratos En Muestras De Agua [en línea]. (Trabajo de Titulación) (Tercer Nivel). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Quito - Ecuador. 2009. S.l.: s.n. [Consulta: 28 de enero de 2021]. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1793/1/CD-2379.pdf>

ROBLEDO VÉLEZ, Laura Melissa, & CASTAÑO PUERTA, Alfredo. Validación de la metodología para el análisis de los metales Cadmio y Plomo en agua tratada por absorción atómica con horno de grafito en el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira [en línea]. (Trabajo de Grado) (Tecnólogo). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de tecnología, Escuela de Química. Pereira - Perú. 2012. S.l.: s.n. [Consulta: 16 de febrero de 2021]. Disponible en: https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/2582/1/Alvarez_Final_art_UISEK.pdf

SÁNCHEZ BARRÓN, Gara. Ecotoxicología del cadmio: riesgo para la salud de la utilización de suelos ricos en cadmio [en línea]. 2016. S.l.: s.n. [Consulta: 16 de febrero de 2021]. Disponible en: http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/GARA_SANCHEZ_BARRON.pdf.

SANMIGUEL TORRES, Jessica Ximena, & GUERRERO CARRERA, Santiago Ricardo. Validación del método para determinar Pb, Cd, Ni por espectrometría de absorción atómica de llama en agua y en suelo [en línea]. (Trabajo de Titulación) (Tercer Nivel). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. Orellana - Ecuador. 2017. S.l.: s.n. [Consulta: 16 de febrero de 2021]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/7019/1/236T0275.pdf>.

SKOOG, D., HOLLER, F. y CROUCH, S., *Principios de análisis fundamental* [en línea]. Sexta edición. México D.F. Cengage Learning. 2008. S.l.: s.n. ISBN 9786074813906. [Consulta: 12 de enero 2021]. Disponible en: https://www.academia.edu/37326567/Principios_de_an%C3%A1lisis_instrumental_6ta_Edici

%C3%B3n_Douglas_A_Skoog_LIBROSVIRTUAL

UTRERAS PEÑAFIEL, Johanna Sofía, & TAPIA CALVOPÍÑA, Luis Iván. Comparación estadística de métodos de extracción para determinar cadmio en granos de cacao. *FACSalud UNEMI* [en línea], Volumen. 5, N° 8, pp. 62. ISSN712021. [Consulta: 12 de enero 2021]. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/facsalud-unemi/article/view/1331/1288>.

LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION-ECIBCE, l=QUITO,
serialNumber=0000621485,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.08.31 12:04:00 -05'00'

ANEXOS

ANEXO A: Informe de validación Cd en cacao.

		INFORME TÉCNICO DE VALIDACION				Código:		
						Copia Controlada 01		
						Revisión: N° #		
						Fecha: 2021		
METODO ANALÍTICO:								
CUANTITATIVO		X		Analito:		CADMIO ALIMENTOS		
CUALITATIVO				Unidades:		mg/Kg		
DE IDENTIFICACIÓN				en matriz: CACAO				
FUNCIÓN DE RESPUESTA				INSTRUMENTAL		DEL MÉTODO		
M				0,121034176		N/A		
S _m				0,001076959		N/A		
L ₀				0,051576423		N/A		
SL ₀				0,006000932		N/A		
Nivel: Conc		Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud		U expand
mg/Kg	Sr	% CVr	SR	% CVR	%recup.	% U (k = 2)		
0,51	0,01	1	0,0056	1	100	102	28	
1,01	0,01	1	0,0106	1	101	102	14	
2,08	0,06	3	0,0676	3	102	106	7	
LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D.):				1,10		mg/Kg		
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.):				0,84		mg/Kg		
SELECTIVIDAD / ESPECIFICIDAD:								
INTERFERENCIAS CONOCIDAS:								
<p>1. La absorción molecular y la dispersión de la luz causadas por partículas sólidas que se forman en el mechero, pueden causar errores positivos.</p> <p>2. Se presenta interferencias de tipo químico, generado por compuestos de cadmio poco estables frente a la temperatura y favoreciendo la volatilidad de los compuestos presentes durante el pre tratamiento térmico, lo que contribuye a aumentar las interferencias y por ende la pérdida del elemento a determinar debido a volatilizaciones conjuntas con la matriz.</p> <p>3. Si las soluciones presentan diferencias de viscosidad y/o tensión superficial, pueden afectar a la aspiración y eficiencia de nebulización en el sistema de atomización</p>								
TIPO DE INTERFERENCIA: Química								
CORRECCIÓN:								
<p>1. Retirar los sólidos presentes con la ayuda de un proceso de filtración</p> <p>2. Controlar con la adición de modificador de matriz preparado a base de fosfato de amonio y Nitrato de magnesio hexahidratado en blancos, muestras y estándares.</p> <p>3. Estas interferencias pueden ser corregidas utilizando el método de adición interna (adición de estándares).</p>								

RANGO DE TRABAJO VALIDADO:						
0,5		hasta		2,0		mg/Kg
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN / RECHAZO:						
NIVEL:	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3			
mg/Kg	0,5	1,0	2			
%CV	1	1	3			
Recuperación (%)						
Desde	100	101	102			
Hasta	102	102	106			
U Expandida						
%U	28	14	7			
Otros:						
No aplica						
CONCLUSIONES Y OBSERVACIONES:						
Luego de realizado el protocolo de validación y verificado que todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios establecidos se determina que el método analítico para Determinación de:						
CADMIO ALIMENTOS			en matriz: CACAO			
es capaz de proveer resultados confiables y por lo tanto el método queda validado a satisfacción del Laboratorio CHAVEZSOLUTIONS Cía. Ltda.						

Aprobado por:

Dr. Luis Soto

Fecha:

15/03/2021

ANEXO B: Procedimientos en la validación de Cd en cacao.



1. Almendras de cacao



2. Pesaje de muestras



3. Adición de Patrón químico para fortificaciones



4. Pre calcinación de muestras.



5. Calcinación de muestras



6. Digestión de muestras.



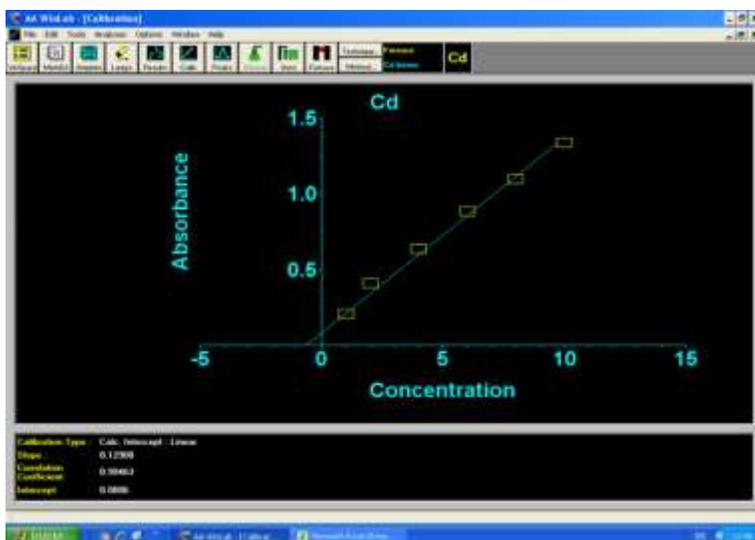
7. Preparación de agua acidulada



8. Muestras filtrándose



9. Ingreso de datos en software



10. Curva de calibración de

0.779 Repl. 1
mg/L

Sample Name	Sample Conc.	Std. Conc.	Blank Conc.	Peak Area	Peak Height	Signal Area	Signal Height	Time	Peak Stored
Sample 10 - Cadm (1) H 1	0.248	0.279	0.004	1182	1274	1182		16.54.46	No
Sample 10 - Cadm (2) H 1	0.511	0.554	0.008	2314	2390	2314		16.57.23	No
Sample 10 - Cadm (3) H 1	0.888	0.942	0.013	4165	4233	4165		17.00.01	No
Sample 10 - Cadm (4) H 1	0.870	0.923	0.013	4080	4148	4080		17.01.40	No

11. Lectura de muestras



Document Information

Analyzed document	JessicaGuamán.pdf (D110618352)
Submitted	7/20/2021 5:59:00 PM
Submitted by	Carlos Medina
Submitter email	carlos.medinas@epoch.edu.ec
Similarity	9%
Analysis address	carlos.medinas.epoch@analysis.arkund.com



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26 / 08 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Jessica Maribel Guamán Gualancañay</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Química</i>
Título a optar: <i>Química</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>



1542-DBRA-UTP-2021